

Klinik für Reproduktionsmedizin
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Heiner Bollwein

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von
Dr. Johannes Lüttgenau

**Einfluss einer induzierten Endometritis auf das Ovar
beim Rind**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
vorgelegt von

Bernhard Lingemann

Tierarzt
aus Hannover, Deutschland

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. med. vet. Heiner Bollwein, Referent
Prof. Dr. agr. Rupert Bruckmaier, Korreferent

2015

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	1
II. Zusammenfassung	2
III. Summary	3
IV. Einleitung	4
V. Material und Methoden.....	8
1. Tiere	8
2. Versuchsaufbau	8
3. Vorbereitung der Reagenzien.....	10
4. Intrauterine Applikation.....	10
5. Blutprobenentnahme	10
6. Ultraschalluntersuchung.....	11
7. Endometriumszytologie	12
8. Analyse von Progesteron, Cortisol, Haptoglobin und Prostaglandin F- Metaboliten.....	13
9. Corpus luteum–Biopsie und Expressionsanalyse.....	14
10. Statistische Analyse	15
VI. Ergebnisse	19
VII. Diskussion.....	28
VIII. Literaturverzeichnis	38
Danksagung	
Curriculum vitae	

II. Zusammenfassung

Einfluss einer induzierten Endometritis auf das Ovar beim Rind

Um den Einfluss einer Endometritis auf das bovine Ovar zu testen, wurde acht Rindern 12 h vor bis 9 d nach der Ovulation (= Tag 1) alle 6 h 9 ml einer Phosphatpufferlösung (PBS) mit oder ohne *E. coli* Lipopolysaccharid (LPS; 3 µg/kg) in randomisierter Reihenfolge intrauterin infundiert. Vor und nach den PBS/LPS-Zyklen wurde jeweils ein unbehandelter Zyklus untersucht (Mittelwert als Kontrolle). In allen Zyklen erfolgten an den Tagen 0, 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 15, 18, und danach alle 2 d bis zur Ovulation, eine Blutprobenentnahme und eine Ultrasonographie der Ovarien. An den Tagen 0, 6 und 9 wurde eine Endometriumszytologie und an den Tagen 6 und 9 eine Corpus luteum (CL)-Biopsie für die RT-qPCR durchgeführt. Eine subklinische Endometritis wurde sowohl nach PBS- als auch nach LPS-Gabe nachgewiesen. Nach LPS-Gabe kam es ausserdem zu einer vorzeitigen Luteolyse, die durch eine Zunahme der PGF-Metaboliten- und eine Abnahme der Progesteron-Konzentration im Plasma, sowie durch eine Reduktion der Grösse und Durchblutung des CL im Vergleich zur Kontrolle gekennzeichnet war ($p \leq 0.05$). Die mRNA-Expressionen von Toll-like Rezeptor 4, PGE-Synthase und Caspase 3 waren nach LPS-Gabe im Vergleich zur Kontrolle höher, während die der steroidogenen Faktoren *STAR* und *HSD3B*, des PGF-Rezeptors und des angiogenen Faktors *VEGFA*₁₂₁ niedriger waren ($p \leq 0.05$). Die wiederholte intrauterine LPS-Applikation während der ersten 9 Zyklustage führt zu einer vorzeitigen Luteolyse des sich anbildenden CL.

Stichworte: Endometritis, Lipopolysaccharide, Corpus luteum, Luteolyse, Rind

III. Summary

Effect of an induced endometritis on the ovary in cattle

To investigate the influence of an endometritis on the bovine ovary, eight heifers received an intrauterine infusion of either 9 mL phosphate buffered saline (PBS) or 9 mL PBS with *E. coli* lipopolysaccharide (LPS; 3 µg/kg) every 6 h from 12 h before until 9 d after ovulation (= Day 1) during two cycles in a random order. An untreated cycle was examined before and after the PBS/LPS cycles, and the mean of the untreated cycles was used as a control. In all cycles, blood sampling and ultrasonography of the ovaries were performed on Days 0, 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 15, 18, and afterwards every 2 d until ovulation. On Days 0, 6, and 9, cytology of the endometrium and on Days 6 and 9, biopsy of the corpus luteum (CL) for RT-qPCR were performed. Subclinical endometritis was detected after both, PBS and LPS treatments. After LPS infusion, a premature luteolysis was observed, which was characterized by an increase in plasma concentrations of PGF metabolite and a decrease in those of progesterone, as well as by a reduction in size and blood flow of the CL compared to the control ($P \leq 0.05$). The mRNA expressions of toll-like receptor 4, PGE synthase and caspase 3 were higher after LPS administration compared to the control, whereas those of the steroidogenic factors *STAR* and *HSD3B*, the PGF receptor and the angiogenic factor *VEGFA*₁₂₁ were lower ($P \leq 0.05$). Repeated intrauterine LPS applications during the first 9 d of the estrous cycle lead to premature luteolysis of the developing CL.

Keywords: endometritis, lipopolysaccharide, corpus luteum, luteolysis, cattle

IV. Einleitung

Die Reproduktionsleistung der Herde ist für den Erfolg einer Milchviehhaltung massgeblich mitverantwortlich. Seit vielen Jahren wird jedoch eine stetige Abnahme der Fertilität hochleistender Milchrinder beobachtet (Lopez-Gatius 2003, Walsh *et al.* 2011). Neben verschiedenen anderen Ursachen reduzieren häufig inflammatorische Erkrankungen des Uterus die Fruchtbarkeit der betroffenen Tiere (Walsh *et al.* 2011). Dabei beträgt die Prävalenz mittels Vaginoskopie diagnostizierter klinischer Metritiden bzw. Endometritiden 15 - 60 Tage *post partum* (*p.p.*) 25.9% (Gautam *et al.* 2009). Die Prävalenz zytologisch diagnostizierter subklinischer Endometritiden lag 40 - 60 Tage *p.p.* sogar bei 53 (Gilbert *et al.* 2005) respektive 25.9% (Cheong *et al.* 2011), wobei in der erstgenannten Studie zwischen der vierten (89%) und achten Woche *p.p.* (41%) eine Abnahme der Prävalenz um 48% beobachtet werden konnte. Das Auftreten von Endometritiden führt zu einem erhöhten Abgangsrisiko beim Einzeltier und zu einer Verschlechterung der Fruchtbarkeitsparameter auf Herdenbasis (LeBlanc *et al.* 2002, Gautam *et al.* 2009). Sowohl bei Tieren mit einer klinischen als auch bei solchen mit einer subklinischen Endometritis war die Wahrscheinlichkeit für eine Gravidität im Vergleich zu gesunden Tieren reduziert (HR = 0.64 - 0.68; Dubuc *et al.* 2010). Tiere mit einer klinischen Endometritis benötigten im Durchschnitt 19 Tage länger um erneut gravid zu werden und die Trächtigkeitsrate am Tag 300 *p.p.* war bei diesen Tieren im Vergleich zu gesunden Tieren um ca. 20% reduziert (Deguillaume *et al.* 2012). Milchkühe mit einer subklinischen Endometritis wiesen 300 Tage *p.p.* ebenfalls eine niedrigere Trächtigkeitsrate auf als gesunde Tiere (63 vs. 89%; Gilbert *et al.* 2005). Bei Tieren mit einer klinischen Endometritis konnte ausserdem ein tendenziell höherer Besamungsindex und ein niedrigerer Erstbesamungserfolg im Vergleich zu gesunden Tieren festgestellt werden (Barlund *et al.* 2008). Reduzierte Trächtigkeitsraten und ein erhöhter Besamungsindex bedingen im Wesentlichen die ökonomischen Verluste, wobei einer erfolgreichen Trächtigkeit ein durchschnittlicher Mehrwert von 278 US \$ zugesprochen wird (De Vries 2006). Es ist daher nicht verwunderlich, dass die jährlich entstehenden Kosten aufgrund von Uteruserkrankungen allein in der EU auf 1.4 Mrd. € beziffert werden (Sheldon *et al.* 2009).

Neben der direkten Schädigung des Endometriums durch eine uterine Infektion, welche die Trächtigkeitsaussichten aufgrund des Vorliegens suboptimaler

Bedingungen für das Einnisten eines Embryos reduziert (Gabler *et al.* 2009, Gilbert 2011), scheint eine Endometritis auch indirekte Auswirkungen auf die ovarielle Funktionsfähigkeit zu haben. So konnte bei Tieren mit einer schweren klinischen Metritis bzw. Endometritis von der ersten bis zur sechsten Woche *p.p.* ein gehäuftes Auftreten ovarieller Dysfunktionen, wie ein verlängerter Anöstrus und zystische Ovarfollikel, beobachtet werden (Mateus *et al.* 2002). Zur Untersuchung der Effekte einer Endometritis auf das Ovar wird in experimentellen Studien oftmals Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, verwendet (Peter *et al.* 1989, Williams *et al.* 2008, Sheldon & Roberts 2010). Mittels einer intrauterinen Applikation von LPS (5 µg/kg KGW) konnte gezeigt werden, dass eine Endometritis die Ovulation inhibiert, indem sie zu einer signifikant niedrigeren Plasmakonzentration an Luteinisierendem Hormon (LH) und zu einem flacheren LH-Peak führt (Peter *et al.* 1989). Da nach einer intrauterinen LPS-Applikation auch Endotoxin im Plasma nachgewiesen werden konnte (Peter *et al.* 1989), scheint es möglich, dass dafür ein systemischer Effekt von LPS auf neuroendokriner Ebene verantwortlich ist. Übereinstimmend mit dieser Vermutung kam es bei einer intravenösen Verabreichung von LPS an Schafe und Rinder zu einer verzögerten oder ausbleibenden Ovulation, die vermutlich auf der gestörten Freisetzung von LH in der Adenohypophyse beruht (Battaglia *et al.* 2000, Suzuki *et al.* 2001). Daneben scheint LPS ausserdem direkt am Ovar die Östradiolproduktion zu hemmen und damit indirekt zu einer verzögerten Ovulation zu führen (Suzuki *et al.* 2001). Rinder, bei denen alle 6 Stunden über einen Zeitraum von 2,5 Tagen LPS intrauterin appliziert wurde, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe ausserdem kleinere Follikel, die durch die Verabreichung einer luteolytischen Dosis von Cloprostenol 25 Stunden vor der ersten LPS-Applikation nicht zur Ovulation gebracht werden konnten, während alle Kontrolltiere nach induzierter Luteolyse ovulierten (Peter *et al.* 1989). Die nicht-ovulierten Follikel persistierten in der genannten Studie über 7 bis 21 Tage auf den Ovarien.

Bei Tieren mit einer klinischen und subklinischen Endometritis konnte im Vergleich zu Tieren ohne Endometritis zudem ein erhöhter Gehalt an LPS in der Follikelflüssigkeit festgestellt werden (Herath *et al.* 2007). Damit LPS an Zellen binden kann, ist ein Rezeptorkomplex bestehend aus dem Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4), dem Cluster of Differentiation 14 (CD14) und dem Myeloid Differentiation Factor 2 (MD2) erforderlich (Beutler 2004). Ein solcher Rezeptorkomplex konnte sowohl für Granulosa- als auch

für Thekazellen nachgewiesen werden (Herath *et al.* 2007, Magata *et al.* 2014a). Hohe LPS-Konzentrationen führten in den Granulosazellen der Follikel zu einer Inhibition der Östradiolproduktion (Shimizu *et al.* 2012, Magata *et al.* 2014b). Eine reduzierte Produktion von Östradiol (E2) wurde selbst bei solchen Granulosazellen nachgewiesen, die zwar *in vivo* dem Einfluss von LPS ausgesetzt waren, aber anschliessend ohne weitere LPS-Exposition *in vitro* kultiviert wurden (Herath *et al.* 2007). Für die reduzierte E2-Konzentration scheint ein negativer Effekt von LPS auf die Transkription der steroidogenen Enzyme Cytochrom P450 17 (CYP17) und P450 Aromatase (CYP19) verantwortlich zu sein, die in den Theka- bzw. Granulosazellen die Umwandlung von Progesteron (P4) in Androstendion (A4) bzw. A4 in E2 katalysieren (Fortune 1994, Magata *et al.* 2014b). In den Thekazellen konnte ausserdem eine Suppression der mRNA Expression des Steroidogenic acute regulatory protein (*STAR*) und des LH-Rezeptors (*LHCGR*) festgestellt werden, was die Produktion von P4 und A4 in diesen Zellen zusätzlich reduzierte (Magata *et al.* 2014a).

Die beschriebenen Effekte einer Endometritis auf die Morphologie und Funktion der ovariellen Follikel werden also zum einen indirekt über die Wirkung von LPS auf Hypothalamus und Hypophyse (Suzuki *et al.* 2001) und zum anderen über einen direkten Effekt von LPS auf Theka- und Granulosazellen (Herath *et al.* 2007, Magata *et al.* 2014a) vermittelt.

Neben den beschriebenen Auswirkungen auf die Ovarfollikel gibt es zunehmend Hinweise, dass Endometritiden auch Effekte auf das bovine Corpus luteum (CL) ausüben. So konnten im Zusammenhang mit einer Metritis bzw. Endometritis ein verspätetes Auftreten des ersten CL *p.p.* und verlängerte Lutealphasen beobachtet werden (Opsomer *et al.* 2000). Letztere scheinen darauf zu beruhen, dass eine Entzündung des Endometriums die uterine Ausschüttung von Prostaglandin (PG) F2 α reduziert (Farin *et al.* 1989, Opsomer *et al.* 2000). Während in der Studie von Opsomer *et al.* (2000) verkürzte Lutealphasen bei Tieren mit Endometritis eine eher untergeordnete Rolle spielten, führte die Induktion einer Endometritis mittels einmaliger intrauteriner Applikation von lebenden *E. coli* im Vergleich zu Kontrolltieren tendenziell zu einer solchen Zyklusverkürzung (Gilbert *et al.* 1990). Wurde die Endometritis allerdings ausschliesslich mit LPS induziert, war keine Veränderung der Zykluslänge zu beobachten (Gilbert *et al.* 1990). Nach einmaliger

intrauteriner Applikation konnte ausserdem kein Effekt von LPS auf die Plasmakonzentrationen von P4 und PGF-Metaboliten (PGFM) festgestellt werden (Gilbert *et al.* 1990). Einmalig intravenös verabreichtes LPS führte jedoch zu einem initialen Anstieg (Gilbert *et al.* 1990, Suzuki *et al.* 2001, Herzog *et al.* 2012) und einer anschliessenden zeitweisen Depression des Plasma-P4-Spiegels (Gilbert *et al.* 1990, Herzog *et al.* 2012). Während der initiale Anstieg der P4-Konzentration auch bei ovariectomierten Rindern beobachtet werden konnte und daher adrenalen Ursprungs zu sein scheint (Kujjo *et al.* 1995), beruht die Abnahme der P4-Konzentration vermutlich auf einer reduzierten Sekretion von lutealem P4 als Reaktion des CL auf das LPS. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass LPS zum einen *in vivo* die mRNA Expression des steroidogenen Faktors *STAR* im Lutealgewebe reduziert (Herzog *et al.* 2012), und zum anderen *in vitro* zu einer verminderten P4-Sekretion der Lutealzellen führt (Mishra & Dhali 2007). Im Gegensatz zur einmaligen intrauterinen LPS-Applikation, war die PGFM-Konzentration nach einmaliger intravenöser LPS-Gabe zwar zehnfach erhöht, führte allerdings nicht zu einer vollständigen Luteolyse (Herzog *et al.* 2012). Neben der bereits erwähnten verminderten Sekretion von P4, wiesen die betroffenen Gelbkörper allerdings auch eine geringere Grösse und eine reduzierte Durchblutung auf (Herzog *et al.* 2012). Die unterschiedlichen Beobachtungen nach einmaliger intrauteriner und intravenöser LPS-Applikation beruhen dabei möglicherweise auf dem höheren Wirkspiegel an LPS, der bei intravenöser Verabreichung am CL erzielt wird. Da eine sehr enge Verbindung zwischen der *Vena (V.) uterina* und der *Arteria (A.) ovarica* beim Rind vorliegt (Ginther 1974), könnte eine mehrmalige intrauterine Applikation von LPS jedoch geeignet sein, das bovine Ovar einer der intravenösen Gabe entsprechend grossen Gesamtmenge an LPS auszusetzen. Ein relativ konstanter LPS-Gehalt im Uterus über mehrere Tage würde zudem die Auswirkungen einer natürlich auftretenden Endometritis besser simulieren als der einmalige LPS-Peak bisheriger Studien.

In der vorliegenden Studie soll daher der Einfluss einer mittels wiederholter intrauteriner LPS-Applikationen induzierten Endometritis auf das bovine Corpus luteum untersucht werden. Dabei wird die Hypothese getestet, dass eine über mehrere Tage anhaltende Endometritis geeignet ist, die Morphologie und Funktion der ovariellen Funktionsgebilde negativ zu beeinflussen.

V. Material und Methoden

1. Tiere

Die Studie wurde an acht weiblichen, nulliparen Rindern (Red Holstein, n=7; Red Holstein [75%] x Limousin [25%], n=1) im Alter von 20.8 ± 3.3 (MW \pm SD) Monaten zwischen Juni und November 2014 durchgeführt. Das mittels Messband (RONDO® Messband zur Körpermassenbestimmung von Vieh; Hoechstmass Balzer GmbH, Sulzbach, Deutschland) geschätzte Gewicht der Tiere betrug zu Versuchsbeginn 448.5 ± 24.5 kg. Die Tiere zeigten ausserdem einen Body Condition Score (BCS) von 3.6 ± 0.3 (Scala 1-5; gemäss Edmonson *et al.* 1989), waren allgemeingesund und wiesen keine Erkrankungen des Genitaltraktes auf.

Alle Tiere bekamen Heu und Wasser *ad libitum*. Zusätzlich erhielten sie 300 g einer Mineralfuttermischung (Mineralfuttermittel für Milchvieh MIN 90-50; Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP), Posieux, Schweiz) sowie 30 g Viehsalz pro Tag.

Vor dem Beginn der Studie wurde den Tieren zwei Wochen lang Zeit gegeben, um sich an den Stall sowie das Stallpersonal des ALP und die anstehenden Untersuchungen zu adaptieren. In diesem Zeitraum wurden bereits regelmäßige Untersuchungen des Allgemeinbefindens und sonographische Untersuchungen des inneren Genitale durchgeführt, um die klinische Gesundheit und einen physiologischen Zyklusablauf zu kontrollieren. Während der Versuchsphase waren die Tiere in einem Anbindestall untergebracht und erhielten zwischen den einzelnen Versuchszyklen Auslauf in einem Laufhof.

Die Verwendung der Tiere für die vorliegende Studie wurde vom Komitee für Tierversuche des Kantons Freiburg, Schweiz, zugelassen (Antrag [25076] 2014_14_FR). Alle Eingriffe an den Tieren erfolgten in Übereinstimmung mit dem Schweizer Tierschutzgesetz.

2. Versuchsaufbau

Nach der Adaptationsphase wurden die Tiere mit einem modifizierten Ovulations-synchronisationsprotokoll (OvSynch) auf den gleichen Zyklusstand gebracht. Das Protokoll beinhaltete die Gabe von 10 µg GnRH (Buserelin; Receptal®, MSD Animal

Health GmbH, Luzern, Schweiz), 15 mg eines PGF₂ α -Analogons (Luprostiol; Prosolvin®, Virbac AG, Glattbrugg, Schweiz) sieben Tage später, und eine zweite Gabe von GnRH 60 Stunden nach der Behandlung mit PGF₂ α . Sämtliche Hormongaben wurden intramuskulär (i.m.) verabreicht. Der Zeitpunkt der zweiten GnRH-Gabe wurde als Östrus definiert (Tag 0 Stunde 0) und der Zeitpunkt 36 Stunden später als Tag der Ovulation (Tag 1 Stunde 0).

Jedes Tier durchlief vier Versuchszyklen: Einen Zyklus ohne Behandlung zu Beginn des Versuchs („Anfangskontrolle“), gefolgt von zwei Zyklen (in randomisierter Reihenfolge), in denen entweder 9 ml einer sterilen Phosphatpufferlösung (PBS; Phosphate Buffered Saline pH 7.4; Sigma Aldrich, St. Louis, USA; „PBS-Zyklus“) oder 9 ml einer sterilen PBS-Lösung mit Lipopolysaccharid (LPS; *E. coli* O26:B6; Sigma Aldrich; 3 μ g/kg KGW; „LPS-Zyklus“) in den Uterus verabreicht wurden, und einem weiteren unbehandelten Zyklus am Ende des Versuchs („Endkontrolle“). Die intrauterinen Applikationen im PBS- und LPS-Zyklus erfolgten ab Tag 0 Stunde 24 bis Tag 9 Stunde 0 in sechsstündigen Intervallen.

In allen Versuchszyklen wurde bei den Tieren an den Tagen 0, 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 15, 18, und im Folgenden alle zwei Tage bis zur Ovulation, eine Blutprobe entnommen und eine ultrasonographische Untersuchung durchgeführt. An den Tagen 0, 6 und 9 des Zyklus erfolgte ausserdem eine Endometriumszytologie und an den Tagen 6 und 9 eine Gelbkörperbiopsie.

Da es im LPS-Zyklus zu einer frühzeitigen Luteolyse kam, wurde lediglich eine Biopsie des Gelbkörpers am Tag 6 des Zyklus vorgenommen und die LPS-Applikation nach erfolgter Ovulation eingestellt. Bei allen Tieren des LPS-Zyklus, bei denen es nach erfolgter Luteolyse zu einer Ovulation kam, wurde der sich neu anbildende Gelbkörper am Tag 9 des Folgezyklus biopsiert.

Zur Kontrolle der Allgemeingesundheit der Tiere während des Versuchs wurde täglich die Rektaltemperatur mit einem Digitalthermometer (scala® Veterinärthermometer SC 12, Scala Electronic GmbH, Strahnsdorf, Deutschland) gemessen sowie der Habitus begutachtet. Während der Behandlungsphase (Tag 0 bis Tag 9) wurden diese Untersuchungen alle 6 Stunden durchgeführt. An den Tagen, an denen eine sonographische Untersuchung erfolgte, wurde ausserdem vor der Sonographie die

Atemfrequenz visuell beobachtet und gezählt und die Herzfrequenz auskultatorisch (3M™ Littmann® Classic II S.E. Stethoskop, St. Paul, USA) erhoben.

3. Vorbereitung der Reagenzien

Die PBS-Lösung wurde unter sterilen Kautelen vorbereitet, zu 9 ml in 10 ml Einwegspritzen (Omnifix®; B. Braun Medical AG, Sempach, Schweiz) abgefüllt und mit einem Kombistopfen (Combi-Stopper; Henry Schein®, Melville, NY, USA) bis zur Verwendung verschlossen. Die LPS-Dosis pro Tier und Applikation (3 µg/kg KGW) wurde in Eppendorfgefäße (PP microtesttube, natural 1.5ml plain Eppendorf type, withstopper Ø10.8x39mm; Vaudaux-Eppendorf AG, Schönenbuch, Schweiz) steril aliquotiert (5 mg LPS pro ml PBS) und bis zur Verwendung eingefroren, um die Wirksamkeit des LPS zu erhalten. Nach dem Auftauen wurde die aliquotierte LPS-Dosis mit 9 ml PBS-Lösung verdünnt und unmittelbar in den Uterus des Versuchstieres eingebracht.

4. Intrauterine Applikation

Die intrauterine Applikation der Substanzen fand unter manueller transrektaler Kontrolle statt. Für die Applikation wurden Einweg-Uteruskatheter (Infusion Pipette KI-2250; Kalayjian Industries, Inc., California, USA) verwendet, die mit einer Hygiene-hülle (Hygienehülle; MINITÜB Abfüll- u. Labortechnik GmbH & Co.KG, Tiefenbach, Deutschland) überzogen wurden. Die Hülle wurde kurz vor dem Erreichen der Zervix durchstossen, um zu verhindern, dass Keime der Vaginalflora in den Uterus gelangen konnten. Nach dem Passieren der Zervix wurde die jeweilige Lösung in das *Corpus uteri* appliziert.

5. Blutprobenentnahme

Vor jeder Ultraschalluntersuchung wurden bei den Versuchstieren Blutproben aus der *V. coccygea mediana* mittels eines Vakuumentnahmesystems (VACUETTE®

multiple use drawing needle, 20G x 1 1/2; Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) entnommen. Es wurden dafür Röhrchen zur Plasmagewinnung (VACUETTE® 9ml K3E K3EDTA; Greiner bio-one) sowie speziell präparierte Röhrchen zur Bestimmung der PGFM-Konzentration (VACUETTE® 9ml Z Ohne Zusatz; Greiner bio-one; versetzt mit 0.3 M EDTA, 1% Acetylsalicylsäure, und mit 15%iger NaOH auf pH 7.5 eingestellt) verwendet. Alle Blutproben wurden nach der Entnahme unmittelbar auf Eis gelagert und anschliessend bei 3,000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde nach der Zentrifugation abpipettiert und bis zur Bestimmung der Konzentrationen von Cortisol, Progesteron, Haptoglobin und PGFM bei -20 °C gelagert.

6. Ultraschalluntersuchung

Die transrektale Ultraschalluntersuchung erfolgte mit einem tragbaren Ultraschallgerät (GE LOGIQ e Premium BT11; General Electric Medical System, Solingen, Deutschland) und einem 4.0 – 12.0 MHz Linearschallkopf (I739-RS Endolinear-Sonde, Version LOGIQe Premium BT11). Für die Messung der Endometriumsdicke wurden je drei Bilder im B-Mode vom linken und rechten Uterushorn ca. 4 cm kranial der *Bifurcatio uteri* aufgenommen. Anschliessend wurden die ovariellen Funktionsgebilde mit ihren maximalen Querschnittsflächen im B-Mode dargestellt. Zur Aufnahme der Bilder im Power-Doppler-Mode wurde der Linearschallkopf bei Darstellung des maximalen Durchmessers des jeweiligen Funktionsgebildes angelegt und kleine Bewegungen des Schallkopfes durchgeführt, um die maximale Ausprägung von Farbpixeln im Randbereich der Gelbkörper bzw. Follikel darzustellen. Von jedem Gelbkörper und von jedem Follikel mit einem Durchmesser >9 mm wurden je drei Bilder im B-Mode und im Power-Doppler-Mode eingefroren und auf dem Ultraschallgerät zwischengespeichert.

Die Auswertung der Bilder wurde mit einer computergestützten Software für Bildanalysen (PixelFlux Version 1.0; Chameleon Software, Leipzig, Deutschland) vorgenommen. Die Endometriumsdicken und die Flächen der Gelbkörper wurden an allen Untersuchungstagen ausgemessen. Falls ein Gelbkörper einen Hohlraum besass, wurde dieser separat bestimmt und von der Gesamtfläche des Gelbkörpers abgezogen. Die Anzahl der Follikelwellen des jeweiligen Brunstzyklus wurde aus-

gezählt und die Fläche des jeweils dominanten Follikels am Tag des retrospektiv bestimmten grössten Follikeldiameters bzw. bei der letzten Aufnahme vor der Ovulation gemessen. Aus den Ergebnissen dreier unabhängiger Messungen für jedes Funktionsgebilde wurde ein Mittelwert berechnet, der für die statistische Auswertung genutzt wurde.

Für die Auswertung der follikulären und lutealen Durchblutung wurden die Bilder aus dem Power-Doppler-Mode zu den der Flächenbestimmung entsprechenden Zeitpunkten herangezogen. Da ein Verhältnis zwischen der Anzahl der farbigen Pixel in den Ultraschallbildern und der Anzahl der sich bewegenden Blutzellen pro Zeit besteht (Beindorff *et al.* 2009), stellt die gemessene Fläche der Farbpixel einen semiquantitativen Wert für den lutealen und follikulären Blutfluss dar. Der relative Blutfluss wurde aus dem Quotient des absoluten Blutflusses und der Fläche des jeweiligen Funktionsgebildes errechnet. Auch hier gingen jeweils die Mittelwerte dreier Messungen in die statistische Analyse ein.

Bei einer Doppelovulation zweier dominanter Follikel und den daraus entstandenen zwei Gelbkörpern wurden der Mittelwert bzw. die Summe (gemäss Bollwein *et al.* 2002) der Follikel- bzw. Gelbkörpermessungen verwendet.

7. Endometriumszytologie

Die Gewinnung der Zellproben vom Endometrium erfolgte mittels eines Cytology-Brush zur Entnahme von Zellen aus dem Rinderuterus (Minitüb GmbH & Co.KG, Tiefenbach, Deutschland), wobei ein Leitröhrchen mit reduziertem Durchmesser verwendet wurde, um Verletzungen innerhalb der Zervix der jungen Rinder zu vermeiden. Als Leitröhrchen diente in dem modifizierten System eine dünnwandige Uterusinfusionspipette (Uterusinfusionspipette für Rinder; Minitüb GmbH & Co.KG), welche an der Vorderseite abgerundet war. Das System wurde unter manueller transrektaler Kontrolle durch die Zervix geleitet. Um eine Verunreinigung während des Einbringens in den Uterus zu vermeiden, wurde das Entnahmesystem mit einer Hygieneschleife (Hygieneschleife; Minitüb GmbH & Co.KG) überzogen, welche vor dem Einführen in die Zervix durchgestossen wurde. Die entnommene Zellprobe wurde unmittelbar auf einem Objektträger (SuperFrost® Objektträger; Gerhard Menzel

GmbH, Braunschweig, Deutschland) ausgestrichen und nach der Trocknung mittels einer Schnelfärbung gefärbt (Diff-Quick Färbeset; Henry Schein, Melville, NY, USA). Die Auszählung der Ausstriche zur Diagnose einer vorliegenden Endometritis, erfolgte modifiziert nach Prieto *et al.* (2012). Hierbei wurde die Anzahl neutrophiler Granulozyten in zehn zufällig ausgewählten Sichtfeldern bei 400-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop (Wild Heerbrugg M20; Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz) ausgezählt. Waren in den zehn Gesichtsfeldern mehr als fünf neutrophile Granulozyten sichtbar, wurde die Probe als ‚Endometritis positiv‘ gewertet.

8. Analyse von Progesteron, Cortisol, Haptoglobin und Prostaglandin F-Metaboliten

Die Plasmakonzentrationen von P4 und Cortisol wurden mit einem kommerziell erhältlichen Radioimmunoassay (RIA) Kit (IM1188 RIA Progesterone; IMMUNOTECH s.r.o., Prag, Tschechische Republik) bzw. einem RIA gemäss Thun *et al.* (1981) an allen Untersuchungstagen gemessen. Für die Bestimmung der Haptoglobinkonzentration im Plasma an den Tagen 0, 6 und 9 wurde ein ebenfalls kommerziell erhältlicher Enzyme-linked Immunosorbentassay (ELISA) Kit (E-10HPT Bovine Haptoglobin ELISA Kit; Immunology Consultants Laboratory, Inc., Portland, USA) verwendet. Die Analysen erfolgten in der Abteilung für Veterinärphysiologie der Vetsuisse Fakultät Universität Bern.

Die Bestimmung von 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α (PGFM) im Plasma erfolgte mittels eines Enzym-Immunoassay (EIA) gemäss Mishra *et al.* (2003). Es wurden Proben von allen Untersuchungstagen gemessen. Das für die Standardkurve benötigte PGFM stammte von der Firma Sigma (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), das PGFM-Meerrettichperoxidase-Konjugat und das Antiserum waren von Herrn Prof. H.H.D. Meyer (Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Deutschland) zur Verfügung gestellt worden. Die Analyse erfolgte im Endokrinologischen Labor der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

9. Corpus luteum–Biopsie und Expressionsanalyse

Vor der Biopsie des CL wurde bei den Tieren eine Epiduralanästhesie mit 40-50 mg Lidocainhydrochlorid (Lidocain 2% Streuli®, G. Streuli & Co. AG, Uznach, Schweiz) durchgeführt, um eine Schmerzausschaltung im biopsierten Bereich zu gewährleisten und die Kontraktion des Rektums zu reduzieren. Es wurden jeweils zwei Biopsien aus den Gelbkörpern der Tiere gewonnen (je 15 mm x 1 mm x 1 mm). Für die Entnahme der Biopsien wurde eine halbautomatische Hochgeschwindigkeit-Biopsienadel (TEMNO Evolution™; Fa. Walter, Baruth/Mark, Germany) verwendet, welche vor dem Gebrauch zunächst desinfiziert, von RNase befreit (RNase-ExitusPlus™; AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und mit einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung (NaCl 0.9% Fresenius; Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) abgespült wurde.

Die Biopsie fand unter Zuhilfenahme eines tragbaren Ultraschallgerätes mit einer konvexen 7.5 MHz Ultraschallsonde statt (GE LOGIQ e Premium BT11; General Electric Medical System). Um ein simultanes Einführen von Biopsienadel und Ultraschallsonde zu ermöglichen, wurde ein Trägersystem (Typ Hannover) verwendet. Für die Biopsie wurde das Trägersystem transvaginal auf Höhe des Gelbkörpers positioniert. Nach Durchstechung der *Fornix vaginae* wurde sodann unter transrektaler Fixierung des Ovars eine Biopsie des Corpus luteum entnommen, welche in RNase-freie Kryogegefäße (Fa. Brand, Wertheim, Germany) verbracht, unmittelbar in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, und anschliessend bei -80° bis zur Expressionsanalyse gelagert wurde. Durch diese Methode wird ein wiederholtes Entnehmen von Lutealgewebe ermöglicht, ohne die spätere Funktion des Gelbkörpers zu beeinträchtigen (Tsai *et al.* 2001).

Bei der Analyse der Gelbkörperbiopsate wurde die relative mRNA Expression von *STAR*, 3-beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase (*HSD3B*), *TLR2* und -4, Caspase 3 (*CASP3*), Tumor Necrosis Factor α (*TNFA*), PGE- (*PGES/PTGES*) und PGF-Synthase (*PGFS/AKR1B1*), PGF Receptor (*PTGFR/FP*), Vascular Endothelial Growth Factor A Isoform 121 (*VEGFA₁₂₁*) und Fibroblast Growth Factor 2 (*FGF2*) bestimmt. Für die Analyse wurde die gesamte RNA der Gewebeproben isoliert und wie kürzlich beschrieben revers transkribiert (Ulbrich *et al.* 2009). Die mRNA Expression wurde in einer zweistufigen quantitativen Real-Time PCR (qPCR) an der ETH Zürich (Tierphysiologie, Institut für Agrarwissenschaften, Schweiz) bestimmt.

Für die Durchführung der PCR wurden das CFX384 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, München, Deutschland) und der SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) verwendet. Die qPCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 µl, bestehend aus 5 µl EvaGreen Mix, 0.4 µl von jedem Primer (10 µM), 0.07 µl VisiBlue (TATAA Biocenter, Göteborg, Schweden), 3.13 µl Wasser und 1 µl cDNA durchgeführt. Die für das Amplifizieren der spezifischen Gen-Fragmente oben genannter Faktoren verwendeten Primer, die Anlagerungstemperatur (AT) und die Schmelzpunkte (SP) sind in Tabelle 1 angegeben. Die Anzahl der erforderlichen Zyklen (C_q), um das definierte Fluoreszenzsignal (SYBR Green) zu erreichen, wurde mithilfe einer Regressionsmethode (Bio-Rad CFX Manager 3.1) errechnet und war umgekehrt proportional zum Logarithmus der initialen Template-Konzentration. Die für die Zielgene bestimmte C_q wurde gegenüber dem geometrischen Mittel der fünf Referenzgene YWHAZ, H3F3A, CNOT11, SUZ12 und TBP abgeglichen (ΔC_q). Um negative Zahlenwerte zu vermeiden, aber den relativen Vergleich zweier Gene zu ermöglichen, wurde ein willkürlicher Zahlenwert von 10 zu den als $MW \pm SEM$ dargestellten Ergebnissen addiert (ΔC_q). Ein hoher ΔC_q entspricht somit einer hohen Transkriptaussprägung des entsprechenden Gens (Livak & Schmittgen 2001). Bei Vorliegen von zwei Corpora lutea nach Doppelovulation wurde der Mittelwert der ΔC_q -Werte beider Gelbkörper für die statistischen Berechnungen verwendet.

10. Statistische Analyse

Es wurden die Daten von je vier Zyklen (Anfangs- [n=7], Endkontrolle [n=8], PBS- [n=7], LPS-Behandlung [n=8]) von acht zur Verfügung stehenden Rindern verwendet, wobei zusätzlich die ersten 9 Tage des Folgezyklus nach dem LPS-Zyklus (NLPS) in die Auswertung eingeschlossen wurden. Bei drei Einzeltierzyklen (Anfangs- [n=1; Enteritis], Endkontrolle [n=2; Tracheobronchitis bzw. Vagino-cervicitis]) konnten nicht alle Daten vollständig erhoben werden, da eine akute Erkrankung des Versuchstieres auftrat und dieses ab dem Zeitpunkt der Erkrankung bis zur vollständigen Genesung (aber zumindest bis zum Ende des Brunstzyklus) von der Datenerhebung ausgeschlossen wurde. Ein Einzeltierzyklus (Endkontrolle) konnte zudem aus organisatorischen Gründen nicht vollständig beendet werden.

Tabelle 1. Untersuchte Gene des bovinen Corpus luteum mit den Akzessionsnummern und Sequenzen der PCR Primer, sowie der Länge, den Anlagerungstemperaturen (AT) und den Schmelzpunkten (SP) der PCR-Produkte.

Gen	Genabkürzung	Referenz [Akz. Nr.]	Forward Primer [5'-...-3']	Reverse Primer [5'-...-3']	PCR- Produkt [bp]	AT [°C]	SP [°C]
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	YWHAZ	NM_174814.2	AGGCTGAGCGATA TGATGAC	GACCCTCCAAGA TGACCTAC	141	60	81
Histone	H3F3A	NM_001014389.2	ACTGGCTACAAAA GCCGCTC	ACTTGCCTCCTG CAAAGCAC	233	60	85
CCR4-NOT transcription complex, subunit 11	CNOT11	XM_582695.6	TCAGTGGACCAAA GCCACCTA	CTCCACACCGGT GCTGTTCT	170	60	87
Suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila)	SUZ12	NM_001205587.1	CATCCAAAAGGTG CTAGGATAGATG	TGGGCCTGCACA CAAGAATG	160	60	82
TATA box binding protein	TBP	NM_001075742.1	CAGAGAGCTCCGG GATCGT	CACCATCTTCCC AGAACTGAATAT	194	60	83
Steroidogenic acute regulatory protein	STAR	NM_174189.2	GGATTAACCAGGT TCGGCG	CTCTCCTTCTTCC AGCCCTC	157	60	89
3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase	HSD3B	NM_174343.3	TACCCAGCTGCTG TTGGA	ATGCCGTTGTTAT TCAAGGC	322	60	87

Toll-like receptor 2	TLR2	NM_174197.2	CCATGTGGAGAGG GTGTT	GGGGACACAAAA CAGCACTT	138	60	81
Toll-like receptor 4	TLR4	NM_174198.6	GACCCTTGCGTAC AGGTTGT	GGTCCAGCATCT TGGTTGAT	103	60	80
Caspase 3	CASP3	NM_001077840.1	AACCTCCGTGGAT TCAAAATC	TTCAGGRTAATC CATTTTGTAAC	114	60	80
Prostaglandin E synthase	PGES (PTGES)	NM_174443.2	TCCTGGTCTTCTTC CTGGG	CCCAGACAATCT GCAGGG	132	60	88
Prostaglandin F synthase	PGFS (AKR1B1)	NM_001012519.1	ATACAAGCCGGCG GTTAAC	TGTCTGCAATCG CTTTGATC	188	60	86
Prostaglandin F receptor	PTGFR (FP)	NM_181025.3	AGCCTTGCCATTG CTATCC	TAGTTCCATTGAT GAGGTGCC	127	60	80
Tumor necrosis factor alpha	TNFA	NM_173966.3	CCACGTTGTAGCC GACATC	ACCACCAGCTGG TTGTCTTC	108	60	86
Vascular endothelial growth factor A isoform 121	VEGFA ₁₂₁	NM_174216	CCGTCCCATTGAG ACCCTG	CGGCTTGTCACA ATTTTCTTGTC	280	60	87
Fibroblast growth factor 2 (basic)	FGF2	NM_174056.3	GAACGGGGGCTTC TTCCT	CCCAGTTCGTTT CAGTGCC	288	60	81

Bei allen Tieren fand als erstes eine Anfangskontrolle statt, um jegliche Carry-over Effekte der Behandlungszyklen auszuschliessen. Um ausserdem mögliche Adaptations- und Wachstumseffekte auszugleichen wurde zusätzlich eine Endkontrolle bei den Tieren durchgeführt und der Mittelwert aus Anfangs- und Endkontrolle (Kontrolle, CON) für alle weiteren Auswertungen herangezogen.

Die Länge der CON- und PBS-Zyklen reichte von 18 bis 26 Tagen. Für die statistische Analyse wurden die erhobenen Daten auf eine einheitliche Zykluslänge von 18 Tagen normalisiert. Bei Tieren die eine Zykluslänge von mehr als 18 Tagen aufwiesen, wurden dafür die Daten ab Tag 15 bis vier Tage vor der Ovulation nicht verwendet. Die Normalisierung erlaubt damit sowohl den Vergleich des Zyklusbeginns und Diöstrus, als auch der letzten Tage des Zyklus vor der folgenden Ovulation. Die Länge des LPS-Zyklus betrug 7 bis 10 Tage und wurde auf 9 Tage normalisiert, indem für den Zyklusbeginn die Daten der ersten sechs Tage und für das Zyklusende die Daten der letzten drei Tage des verkürzten Zyklus verwendet wurden. Bei den Tieren, bei denen es im LPS-Zyklus zu keiner Ovulation kam, wurden die ersten 9 Tage des Zyklus verwendet.

Die Analyse von PGFM wies eine untere Nachweisgrenze von 12 ng/ml auf. Für Messungen unterhalb dieser Nachweisgrenze, wurden 11 ng/ml als willkürlicher Wert genutzt, um die statistische Analyse zu vereinfachen. Da sich der Verlauf der PGFM-Konzentration nicht zwischen den Bestimmungen aus EDTA-Plasma und Plasma mit Aspirinzusatz unterschied, wurden die Mittelwerte der Ergebnisse aus den verschiedenen Proben zu jedem Zeitpunkt verwendet.

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistical Analysis System V9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Die Verteilung der Daten wurde mittels des Shapiro-Wilk-Tests (PROC UNIVARIATE) bestimmt. Nach Durchführung eines Repeated measure ANOVA (PROC GLM), wurden abhängige paarweise Vergleiche zwischen den Kontroll- und Behandlungszyklen bei Normalverteilung der Daten mit dem Student's t-Test (PROC MEANS) und bei Nicht-Normalverteilung mit dem Wilcoxon's signed rank-Test (PROC UNIVARIATE) durchgeführt. Bei allen Vergleichen wurden Unterschiede mit $p \leq 0.05$ als signifikant angesehen.

VI. Ergebnisse

Die Atemfrequenz, Herzfrequenz und Rektaltemperatur unterschieden sich an den einzelnen Untersuchungstagen in den Behandlungszyklen (PBS, LPS) nicht vom Kontrollzyklus ($p > 0.05$), in dem durchschnittliche Werte von 37.0 ± 1.8 (MW \pm SEM) Atemzügen/min, 84.0 ± 2.1 Herzschlägen/min und 38.5 ± 0.01 °C gemessen wurden.

Die mittlere Plasma-Cortisolkonzentration während des Zyklus wies keinen Unterschied ($p > 0.05$) zwischen dem PBS-, LPS- bzw. NLPS-Zyklus und dem Kontrollzyklus auf. Im CON-Zyklus betrug die Cortisolkonzentration durchschnittlich 4.15 ± 0.51 nmol/l. Es konnten ausserdem keine signifikanten Unterschiede in der Plasma-Haptoglobinkonzentration nach PBS- bzw. LPS-Applikation im Vergleich zum Kontrollzyklus festgestellt werden ($p > 0.05$), der an den Tagen 0, 6 und 9 einen durchschnittlichen Haptoglobinwert von 947.85 ± 135.34 ng/ml aufwies.

Die durchschnittliche Zykluslänge (Intervall zwischen zwei Ovulationen) wich im PBS-Zyklus nicht vom Kontrollzyklus ab ($p > 0.05$) und betrug 21.7 ± 1.0 (PBS) bzw. 20.8 ± 0.7 Tage (CON). Die LPS-Zyklen hatten im Mittel eine Länge von 8.5 ± 0.4 Tagen und waren damit kürzer verglichen mit den CON- ($p < 0.0001$) und PBS-Zyklen ($p = 0.0003$). Bei 2 von 8 Rindern kam es jedoch nach der LPS-Applikation zu einer Luteolyse ohne anschliessende Ovulation trotz vorhandener Follikel >12 mm auf den Ovarien.

Die Endometriumsdicke war im LPS-Zyklus an den Tagen 2, 6, 8 und 9 im Vergleich zum Kontrollzyklus erhöht ($p < 0.05$; Abb. 1). Ausserdem war das Endometrium an den Zyklustagen 6 und 12 im PBS-Zyklus ($p < 0.05$) und am Tag 1 im NLPS-Zyklus ($p = 0.01$) dicker als im CON-Zyklus. Über den gesamten Zyklus gesehen, war das Endometrium im PBS-Zyklus mit 7.66 ± 0.10 mm dicker ($p = 0.02$) als im CON-Zyklus mit 7.17 ± 0.12 mm. Alle Tiere wiesen nach der PBS- bzw. LPS-Gabe eine subklinische Endometritis auf, während im Kontrollzyklus kein Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der Endometriumszytologie nachgewiesen werden konnte.

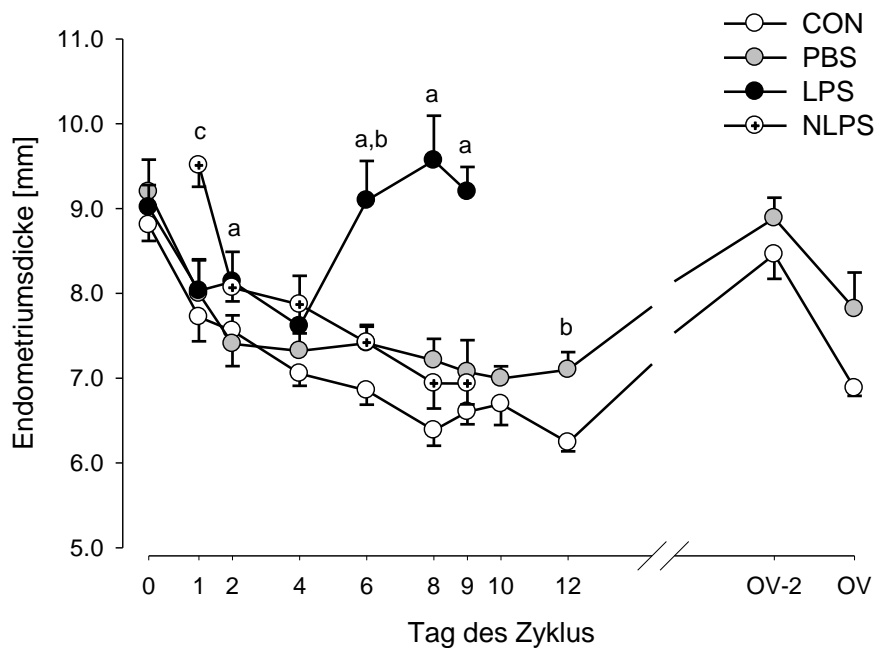


Abb. 1. Endometriumsdicke (MW \pm SEM) während des Brunstzyklus bei unbehandelten Tieren (CON), bei Tieren mit PBS- bzw. LPS-Applikation im 6-Stunden-Intervall zwischen den Tagen 0 und 9 (Tag 1 = Ovulation, OV), sowie im Zyklus nach dem LPS-Zyklus (NLPS).

^{a,b,c} Unterschied ($p < 0.05$) zwischen den CON- und LPS-Zyklen (a), den CON- und PBS-Zyklen (b) und den CON- und NLPS-Zyklen (c)

Die PGFM-Konzentrationen im Plasma lagen im LPS-Zyklus an den einzelnen Tagen des Behandlungszeitraums (Tag 1 bis 9) numerisch über den Werten des Kontrollzyklus ($p > 0.10$; Abb. 2A). Die durchschnittliche PGFM-Konzentration während dieses Zeitraums war im LPS-Zyklus höher als im Kontrollzyklus ($p = 0.03$; Abb.2B), während sie sich zwischen dem PBS- bzw. NLPS-Zyklus und dem CON-Zyklus nicht unterschied ($p > 0.05$).

Die P4-Konzentration im Plasma war an den Tagen 6, 8 und 9 im LPS-Zyklus geringer als im Kontrollzyklus ($p < 0.05$), während sie sich zwischen dem PBS- und CON-Zyklus nicht unterschied (Abb. 3A). Im NLPS-Zyklus konnten verglichen mit dem CON-Zyklus niedrigere P4-Werte an den Tagen 2 ($p = 0.003$) und 4 ($p = 0.009$) festgestellt werden.

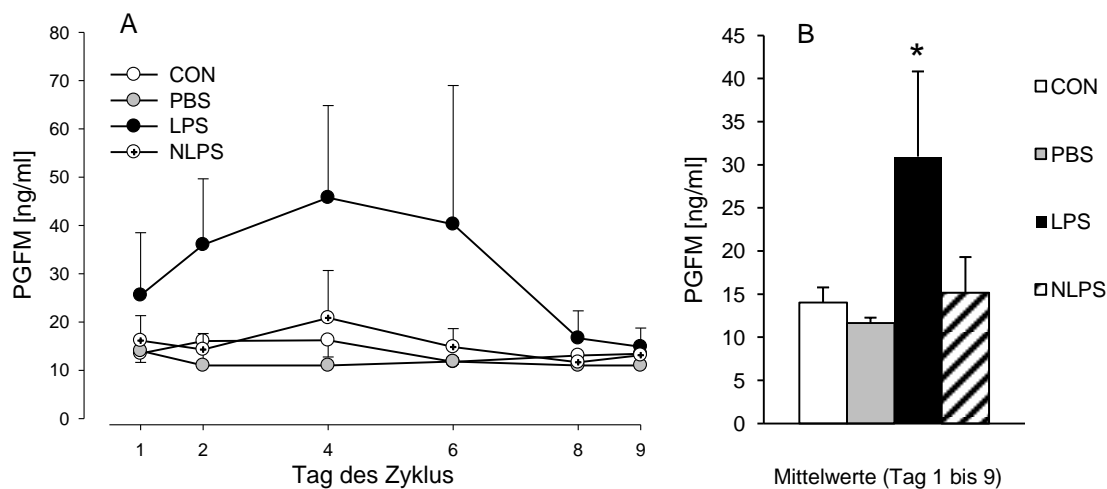


Abb. 2. Plasma-PGFM-Konzentrationen (MW \pm SEM) an den Tagen 1 bis 9 des Brunstzyklus (A; Tag 1 = Ovulation) und Mittelwerte der PGFM-Konzentrationen in diesem Zeitraum (B) im unbehandelten Zyklus (CON), im Zyklus mit PBS- bzw. LPS-Applikation im 6-Stunden-Intervall zwischen den Tagen 0 und 9, sowie im Zyklus nach dem LPS-Zyklus (NLPS).

*Bei Säulen mit einem Stern unterscheidet sich ($p < 0.05$) der Mittelwert von dem des Kontrollzyklus.

Die Querschnittsfläche des Gelbkörpergewebes war an den Tagen 8 und 9 im PBS-Zyklus grösser und im LPS-Zyklus kleiner als im Kontrollzyklus ($p < 0.05$; Abb. 3B). Die Grösse der Gelbkörperfläche unterschied sich jedoch nicht zwischen dem NLPS- und CON-Zyklus ($p > 0.05$). Bei jeweils einem Tier des CON- und PBS-Zyklus kam es zu einer Doppelovulation mit einer Ausbildung von zwei Corpora lutea.

Die luteale Durchblutung war im LPS-Zyklus an den Tagen 6, 8 und 9 geringer ($p < 0.05$) und im PBS-Zyklus am Tag 9 höher ($p = 0.05$) im Vergleich zum Kontrollzyklus (Abb. 3C). Der relative Blutfluss im LPS-Zyklus war am Tag 1 höher (0.30 ± 0.04 vs. 0.18 ± 0.03 ; $p = 0.003$) und an den Tagen 8 (0.04 ± 0.01 vs. 0.15 ± 0.02 ; $p = 0.02$) und 9 niedriger (0.03 ± 0.01 vs. 0.14 ± 0.02 ; $p = 0.002$) als im Kontrollzyklus. Weder der absolute noch der relative Blutfluss unterschieden sich ($p > 0.05$) zwischen dem NLPS- und dem CON-Zyklus.

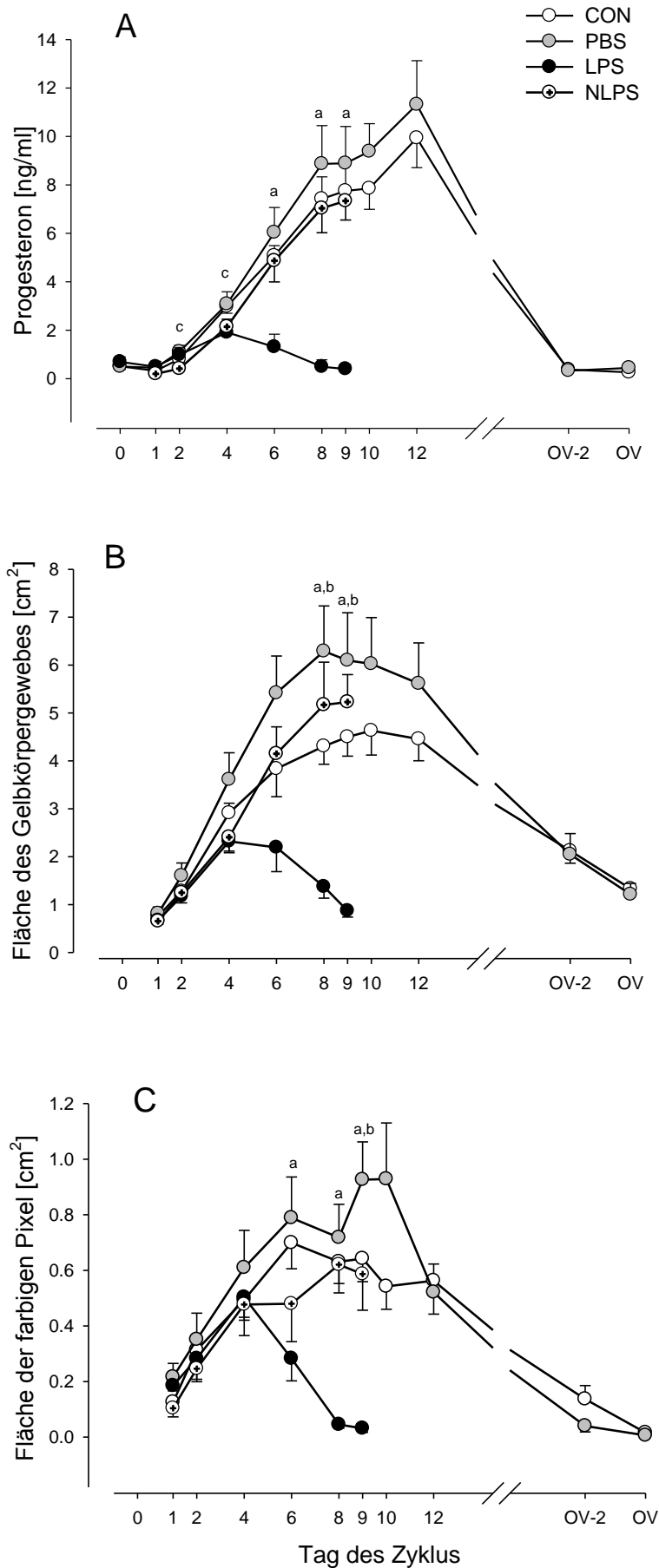


Abb. 3.

Plasma-Progesteron (P4)-Konzentration (MW \pm SEM; A), Gelbkörpergrösse (B) und Fläche der farbigen Pixel, welche eine semi-quantitative Einschätzung der Gelbkörperdurchblutung erlaubt (C), im unbehandelten Zyklus (CON), im Zyklus mit PBS- bzw. LPS-Applikation im 6-Stunden-Intervall zwischen den Tagen 0 und 9 des Brunstzyklus (Tag 1 = Ovulation, OV), sowie im Zyklus nach dem LPS-Zyklus (NLPS).

^{a,b,c} Unterschied ($p < 0.05$) zwischen den CON- und LPS-Zyklen (a), den CON- und PBS-Zyklen (b) und den CON- und NLPS-Zyklen (c)

Die Anzahl der Follikelwellen unterschied sich nicht zwischen dem CON- (2.4 ± 0.2) und PBS-Zyklus (2.7 ± 0.5 ; $p > 0.05$). Im LPS-Zyklus konnte hingegen bei allen Tieren im Gegensatz zum Kontroll- ($p = 0.008$) bzw. PBS-Zyklus ($p = 0.002$) nur eine Follikelwelle beobachtet werden. Der dominante Follikel der ersten Follikelwelle war im NLPS-Zyklus grösser im Vergleich zum Kontroll- ($p = 0.001$) und PBS-Zyklus ($p = 0.01$; Tab. 2). Die Grösse des präovulatorischen Follikels (erste Follikelwelle) im LPS-Zyklus unterschied sich weder von der Grösse der dominanten Follikel der ersten Welle, noch von der Grösse der präovulatorischen Follikel der zweiten Welle in den CON- und PBS-Zyklen ($p > 0.05$).

Tab. 2. Follikelgrösse (FS) und follikulärer Blutfluss (FBF; MW \pm SEM) des dominanten Follikels der ersten Welle bei maximalem Durchmesser vor der Regression (bzw. Ovulation im LPS-Zyklus) und des präovulatorischen Follikels bei maximalem Durchmesser vor der Ovulation bei unbehandelten Tieren (Kontrollzyklus; CON), bei Tieren mit PBS- bzw. LPS-Applikation im 6-Stunden-Intervall zwischen den Tagen 0 und 9 des Brunstzyklus (Tag 1 = Ovulation), sowie im Zyklus nach dem LPS-Zyklus (NLPS).

	Dominanter Follikel (1. Welle)		Präovulatorischer Follikel	
	FS	FBF	FS	FBF
CON	1.75 ± 0.13^a	0.03 ± 0.006	1.82 ± 0.12	0.04 ± 0.007
PBS	1.92 ± 0.16^a	0.02 ± 0.009	1.73 ± 0.14	0.05 ± 0.01
LPS	$2.14 \pm 0.22^{a,b}$	0.05 ± 0.02	2.14 ± 0.22	0.05 ± 0.02
NLPS	2.06 ± 0.19^b	0.02 ± 0.007	-	-

^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich ($P \leq 0.05$) innerhalb einer Spalte.

Die mRNA Expression der steroidogenen Faktoren *STAR* und *HSD3B* war im LPS-Zyklus niedriger als im Kontrollzyklus ($p < 0.05$; Abb. 4). Die Expression von *STAR*

und *HSD3B* unterschied sich allerdings nicht ($p > 0.05$) zwischen dem PBS- bzw. NLPS-Zyklus und dem Kontrollzyklus.

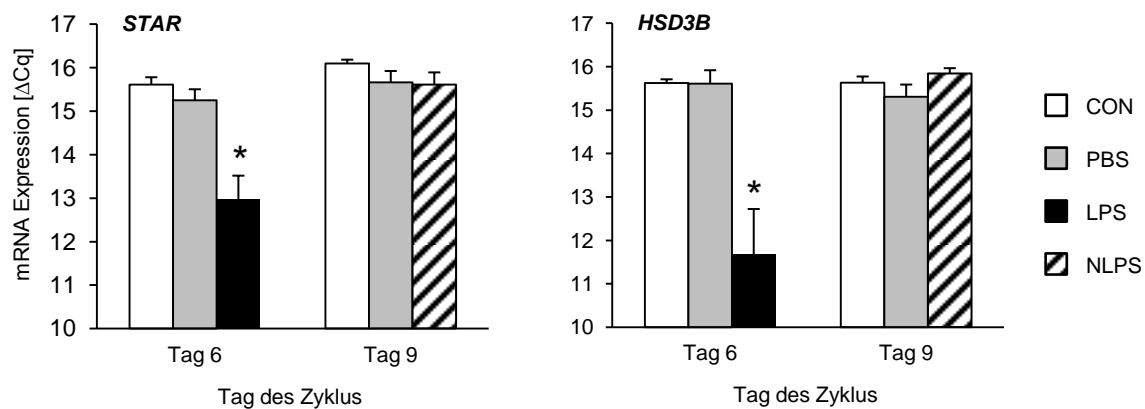


Abb. 4 Luteale mRNA Expression (MW \pm SEM) des Steroidogenic Acute Regulatory Protein (*STAR*) und der 3-beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase (*HSD3B*), bei unbehandelten Tieren (CON), bei Tieren mit PBS- bzw. LPS-Applikation im 6-Stunden-Intervall zwischen den Tagen 0 und 9 des Brunstzyklus (Tag 1 = Ovulation) und bei Tieren im Zyklus nach dem LPS-Zyklus (NLPS).

*Bei Säulen mit einem Stern unterscheidet sich ($p < 0.05$) der Mittelwert von dem des Kontrollzyklus.

Während die mRNA Expression von *TNFA* keinen Unterschied ($p > 0.05$) zwischen den PBS-, LPS- bzw. NLPS-Zyklen und dem Kontrollzyklus aufwies (Abb. 5), war die luteale Expression von *CASP3* nach LPS-Gabe im Vergleich zum Kontrollzyklus erhöht ($p < 0.05$; Abb. 5).

Es konnten keine Unterschiede in der Expression von *TLR2* zwischen den PBS-, LPS- bzw. NLPS-Zyklen und dem Kontrollzyklus festgestellt werden ($p > 0.05$; Abb. 6), während *TLR4* im Lutealgewebe nach LPS-Gabe im Vergleich zum Kontrollzyklus höher exprimiert war ($p < 0.05$; Abb. 6).

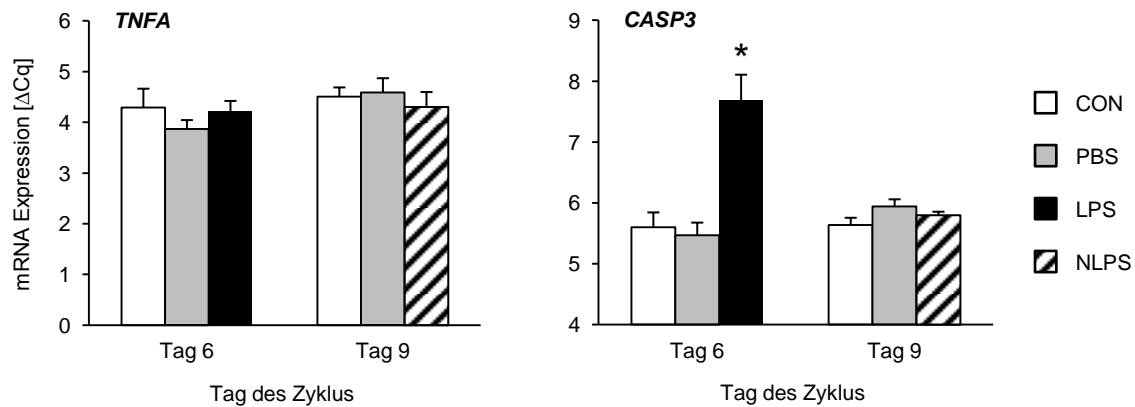


Abb. 5. Luteale mRNA Expression (MW \pm SEM) der Caspase 3 (*CASP3*) und des Tumor Necrosis Factor α (*TNFA*), bei unbehandelten Tieren (CON), bei Tieren mit PBS- bzw. LPS-Applikation im 6-Stunden-Intervall zwischen den Tagen 0 und 9 des Brunstzyklus (Tag 1 = Ovulation) und bei Tieren im Zyklus nach dem LPS-Zyklus (NLPS).

*Bei Säulen mit einem Stern unterscheidet sich ($p < 0.05$) der Mittelwert von dem des Kontrollzyklus.

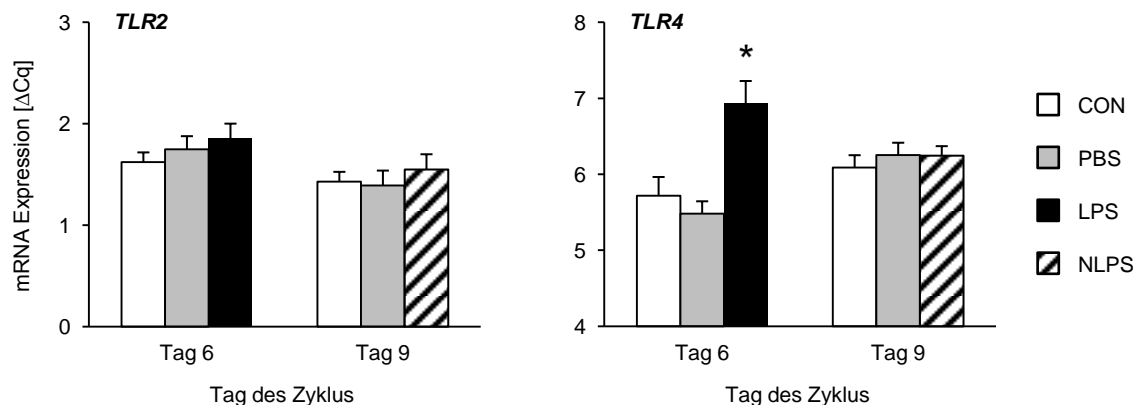


Abb. 6. Luteale mRNA Expression (MW \pm SEM) des Toll-like Receptor 2 (*TLR2*) und -4 (*TLR4*), bei unbehandelten Tieren (CON), bei Tieren mit PBS- bzw. LPS-Applikation im 6-Stunden-Intervall zwischen den Tagen 0 und 9 des Brunstzyklus (Tag 1 = Ovulation) und bei Tieren im Zyklus nach dem LPS-Zyklus (NLPS).

*Bei Säulen mit einem Stern unterscheidet sich ($p < 0.05$) der Mittelwert von dem des Kontrollzyklus.

Während die luteale Expression von *PGES* nach LPS-Gabe im Vergleich zum Kontrollzyklus höher war ($p < 0.05$; Abb. 7), wiesen die mRNA Expressionen von *PGFS* weder im PBS-, noch im LPS- und NLPS-Zyklus einen Unterschied im Vergleich zum Kontrollzyklus auf ($p > 0.05$; Abb. 7). Die Expression von *PTGFR* war nach LPS-Gabe im Vergleich zum Kontrollzyklus reduziert ($p < 0.05$; Abb. 7).

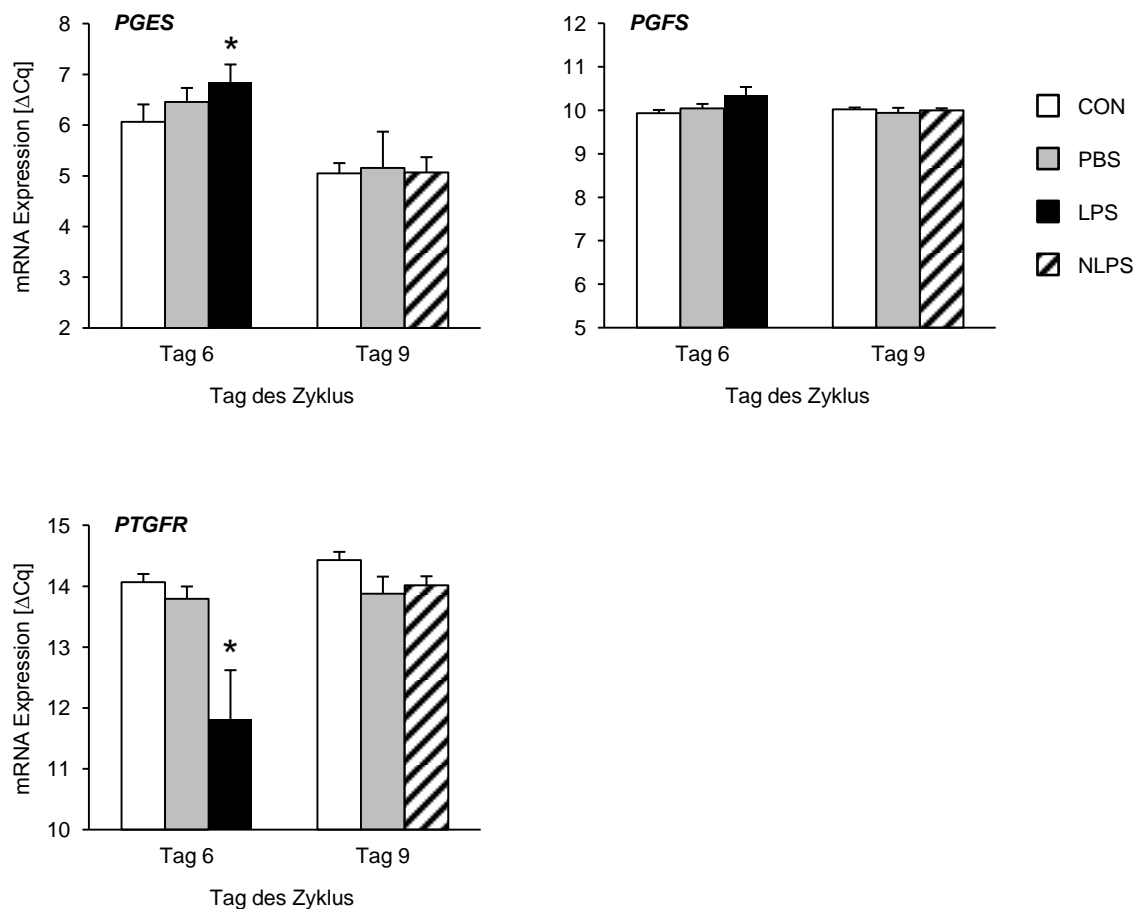


Abb. 7. Luteale mRNA Expression (MW \pm SEM) der Prostaglandin E- und Prostaglandin F- Synthasen (*PGES* und *PGFS*) und des Prostaglandin F Receptor (*PTGFR*) bei unbehandelten Tieren (CON), bei Tieren mit PBS- bzw. LPS-Applikation im 6-Stunden-Intervall zwischen den Tagen 0 und 9 des Brunstzyklus (Tag 1 = Ovulation) und bei Tieren im Zyklus nach dem LPS-Zyklus (NLPS).

*Bei Säulen mit einem Stern unterscheidet sich ($p < 0.05$) der Mittelwert von dem des Kontrollzyklus.

Der angiogene Faktor *VEGFA*₁₂₁ war im Lutealgewebe nach LPS-Gabe im Vergleich zum Kontrollzyklus geringer exprimiert ($p < 0.05$; Abb. 8), während sich die Expression zwischen dem PBS- bzw. NLPS-Zyklus und dem CON-Zyklus nicht unterschied ($p > 0.05$). Bei der lutealen Expression von *FGF2* konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zyklen festgestellt werden ($p > 0.05$; Abb. 8).

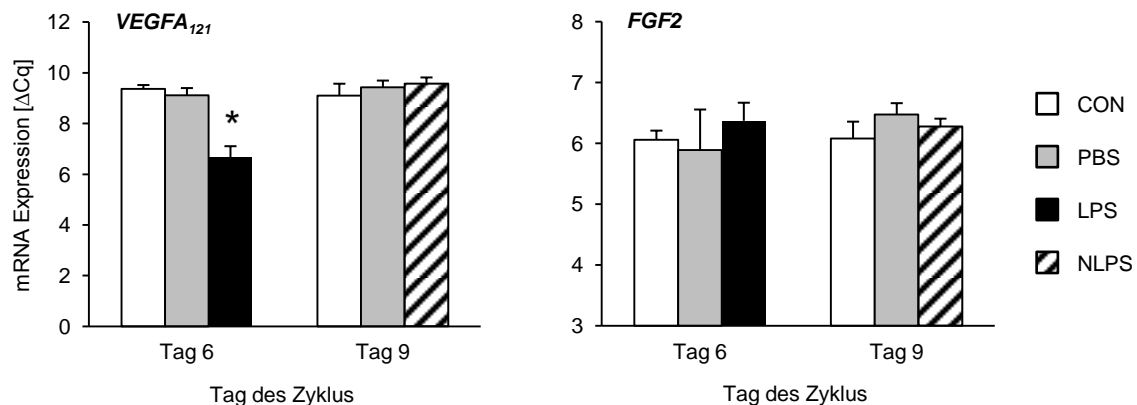


Abb. 8. Luteale mRNA Expression (MW \pm SEM) des Vascular Endothelial Growth Factor A Isoform 121 (*VEGFA*₁₂₁) und des Fibroblast Growth Factor 2 (*FGF2*), bei unbehandelten Tieren (CON), bei Tieren mit PBS- bzw. LPS-Applikation im 6-Stunden-Intervall zwischen den Tagen 0 und 9 des Brunstzyklus (Tag 1 = Ovulation) und bei Tieren im Zyklus nach dem LPS-Zyklus (NLPS).

*Bei Säulen mit einem Stern unterscheidet sich ($p < 0.05$) der Mittelwert von dem des Kontrollzyklus.

VII. Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte sowohl in den Zyklen mit intrauteriner LPS- als auch in denen mit intrauteriner PBS-Applikation zytologisch eine Endometritis diagnostiziert werden, sodass die wiederholte Passage der Zervix und nicht das verabreichte Agens für diesen Effekt verantwortlich zu sein scheint. Bei Stuten führte allein die zervikale Dilatation ebenfalls zu einer uterinen Inflammation (Handler *et al.* 2006). Da die Reihenfolge der LPS- und PBS-Zyklen bei den Rindern randomisiert erfolgte und ausserdem keine subklinische Endometritis in den unbehandelten Kontrollzyklen nach den LPS- und PBS-Zyklen auftrat, lässt sich ein Carry-over Effekt von LPS auf PBS- oder Kontrollzyklen nahezu ausschliessen.

Nach der intrauterinen Applikation von LPS und PBS trat bei den Rindern keine Veränderung der Vitalparameter (Herzfrequenz, Atemfrequenz und Körperinnentemperatur) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzyklen auf. Im Gegensatz dazu wurden nach einer intravenösen Behandlung mit LPS (0.5 µg/kg KGW) eine Tachykardie und Tachypnoe festgestellt sowie eine auf bis zu 40.4 °C erhöhte Rektaltemperatur gemessen (Herzog *et al.* 2012). Da diese Parameter auch nach intramammärer LPS-Applikation (10 µg/Tier) deutlich erhöht waren (Lavon *et al.* 2008), scheint das Endometrium gegenüber einer lokalen Stimulation mit LPS im Hinblick auf eine systemische Immunantwort relativ unempfindlich zu sein.

In der vorliegenden Studie konnte bei den Tieren im LPS-Zyklus kein signifikanter Unterschied in der Plasma-Cortisolkonzentration im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. In einer anderen Studie kam es jedoch nach wiederholter intrauteriner Applikation von LPS (5 µg/kg) im Vergleich zur Kontrolle zu einem Anstieg in der Cortisolkonzentration im Serum von Färsen (Peter *et al.* 1989). Der Grund für die abweichenden Befunde könnte die niedrigere LPS-Dosierung von 3 µg/kg in der vorliegenden Studie gewesen sein. Da Cortisol häufig als ein Indikator für Stress bei Rindern genutzt wird (Mudron *et al.* 2007, Mosher *et al.* 2013), kann daraus geschlossen werden, dass bei einer intrauterinen LPS-Applikation in der vorliegenden Dosierung keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefinden der Tiere auftrat.

Ebenfalls konnte keine signifikante Erhöhung der Haptoglobinkonzentration im Plasma nach intrauteriner Applikation von LPS im Vergleich zur Kontrolle festgestellt

werden. Das Akute Phase Protein Haptoglobin wird bei einer ansteigenden Entzündung als unspezifische Abwehrreaktion vermehrt gebildet (Murata *et al.* 2004). Eine Akute Phase Reaktion ist jedoch ausserdem durch die erhöhte Produktion inflammatorischer Zytokine und durch Fieber charakterisiert (Ma *et al.* 2011). Der fehlende Anstieg der Rektaltemperatur stimmt mit der unveränderten Haptoglobinkonzentration überein und lässt darauf schliessen, dass Applikationsort und -menge von LPS in der vorliegenden Studie nicht geeignet waren, um eine Akute Phase Reaktion auszulösen.

Die Länge des LPS-Zyklus war in der vorliegenden Studie aufgrund einer vorzeitigen Luteolyse signifikant kürzer als die des Kontroll- und PBS-Zyklus, während nach einmaliger intrauteriner Applikation von LPS (5 µg/kg KGW) zwischen Tag 7 und 9 des Zyklus keine Auswirkungen auf die Zykluslänge beobachtet werden konnten (Gilbert *et al.* 1990). Der Grund für den verkürzten Zyklus scheint also in der wiederholten LPS-Applikation über einen längeren Zeitraum zu liegen. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung führte die Induktion einer Endometritis mittels einmaliger intrauteriner Applikation lebender *E. coli*, welche eine länger anhaltende Exposition des Endometriums gegenüber LPS verursachten, ebenfalls tendenziell zu einer Zyklusverkürzung (Gilbert *et al.* 1990).

Im LPS-Zyklus ovulierten jedoch zwei von acht Tieren trotz nachweisbarer Luteolyse nicht. Auch in einer anderen Studie, in der eine wiederholte intrauterine Applikation von LPS während der ersten 9 Zyklostage erfolgte, ovulierten nach PGF-induzierter Luteolyse am Tag 7 weniger Kühe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit intrauteriner PBS-Applikation (Williams *et al.* 2008). Da in der Studie von Williams *et al.* (2008) keine signifikanten Unterschiede in der LH-Konzentration oder in der Frequenz seiner pulsatilen Freisetzung zwischen der LPS- und Kontrollgruppe festgestellt werden konnten, wurde eine LPS-induzierte Reduktion der LH-Rezeptoren auf den Granulosazellen als Ursache für das Ausbleiben der Ovulation vermutet.

Die vergleichbaren Veränderungen der Endometriumsdicke in den Kontroll- und PBS-Zyklen mit höheren Werten im Östrus können mit den physiologischen, zyklusbedingten Veränderungen des Endometriums erklärt werden, die eine Reduktion von Progesteron und den Anstieg von Östrogen zur Brunst beschreiben (Johnson *et al.* 1997, Souza *et al.* 2011). Auch der vorzeitige Anstieg der Endometriumsdicke im LPS-Zyklus (ab dem 6. bis 10. Zyklostag) lässt sich über

einen niedrigen Progesterongehalt im Blut aufgrund der frühzeitigen Luteolyse und einen damit überwiegenden Östrogeneinfluss auf das Endometrium erklären (Johnson *et al.* 1997, Souza *et al.* 2011). Das Endometrium war ausserdem am Tag 1 des NLPS-Zyklus signifikant dicker als am ersten Tag des Kontrollzyklus. Da die Plasma-P4-Konzentrationen zu Beginn (Tag 2 und 4) des NLPS-Zyklus signifikant niedriger waren als zu Beginn des Kontrollzyklus, könnte der länger niedrig bleibende P4-Spiegel gemäss Souza *et al.* (2011) die Zunahme der Endometriumsdicke im NLPS-Zyklus erklären. Die mittlere Endometriumsdicke über den gesamten Zyklus wies nach PBS-Applikation verglichen mit dem Kontrollzyklus signifikant höhere Werte auf, sodass eine inflammatorische Reizung und Ödematisierung des Endometriums als Ursache für die erhöhte Endometriumsdicke nicht ausgeschlossen werden kann. Dementsprechend wird die Messung der Endometriumsdicke auch als eine Möglichkeit der Diagnose einer Endometritis (>8 mm) angeführt, wobei ihr jedoch nur eine sehr niedrige Sensitivität von 11.4% attestiert wird (Barlund *et al.* 2008). Ein entsprechender Vergleich der mittleren Endometriumsdicke über den gesamten Zyklusverlauf zwischen dem LPS- und Kontrollzyklus erscheint nicht sinnvoll, da der LPS-Zyklus im Vergleich zum Kontrollzyklus sehr viel kürzer ist und damit die auf den Östrus zurückzuführenden Effekte im LPS-Zyklus wesentlich stärker den Mittelwert beeinflussen. Zum anderen spielt der reduzierte P4-Spiegel im LPS-Zyklus sehr wahrscheinlich eine bedeutendere Rolle für die Dickenzunahme des Endometriums als die LPS-Exposition. Ein Hinweis auf einen zusätzlichen Effekt des LPS selbst ist jedoch die frühe Dickenzunahme des Endometriums bereits am Tag 2 des LPS-Zyklus im Vergleich zur Kontrolle, obwohl sich die P4-Spiegel zwischen den beiden Zyklen zu diesem Zeitpunkt noch nicht unterscheiden. Auch die beschriebene erhöhte Endometriumsdicke am Tag 1 des NLPS-Zyklus könnte Ausdruck einer anhaltenden Reizung des Endometriums durch das LPS im vorangegangenen Zyklus sein.

Die durchschnittliche PGFM-Konzentration im Plasma war während der Behandlungsphase (Tag 1 bis 9) im LPS-Zyklus der vorliegenden Studie signifikant höher als im Kontrollzyklus. Eine einmalige intrauterine Applikation von LPS (5 µg/kg KGW) führte bei Kühen 5 Tage *p.p.* ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der PGFM-Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Peter *et al.* 1990), während sie bei zyklischen Färsen keine signifikante Änderung der PGFM-Konzentration im Plasma verursachte (Gilbert *et al.* 1990). Da während der ersten Tage *p.p.* bei allen

Rindern eine bakterielle Kontamination des Uterus vorliegt und aufgrund der sehr wahrscheinlichen Anwesenheit von *E. coli* eine kontinuierliche Freisetzung von LPS stattfindet (Sheldon *et al.* 2002, Magata *et al.* 2015), lässt sich die Studie von Peter *et al.* (1990) eher mit der vorliegenden Studie vergleichen und bestätigt den Zusammenhang zwischen einer anhaltenden Exposition des Endometriums gegenüber LPS und erhöhten PGFM-Konzentrationen im Plasma. Übereinstimmend konnten bei Kühen mit einer schweren im Vergleich zu einer milden Metritis signifikant höhere Endotoxinkonzentrationen in der Uterusflüssigkeit und PGFM-Konzentrationen im Plasma festgestellt werden (Mateus *et al.* 2003). Ursächlich für die erhöhten PGFM-Gehalte im Plasma könnte dabei die uterine Ausschüttung von PGF2 α als Folge der dauerhaften Reizung des Endometriums durch das LPS sein. So berichten Leung *et al.* (2001) von einer um fast das Doppelte erhöhten PGF2 α -Freisetzung aus bovinen Endometriumsexplantaten nach LPS-Exposition im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings wurde in der gleichen Studie auch eine um mehr als fünffach erhöhte Ausschüttung von dem als luteotrop geltenden PGE2 nach der LPS-Exposition festgestellt (Leung *et al.* 2001). Auch in einer Studie von Herath *et al.* (2006) konnte durch die Exposition von bovinen Endometriumsexplantaten gegenüber LPS sowohl eine erhöhte Ausschüttung von PGF2 α als auch von PGE2 induziert werden, wobei die stromalen Zellen des Endometriums überwiegend mit einer Freisetzung von PGE2 und die epithelialen Zellen mit der Freisetzung von PGF2 α reagieren (Asselin *et al.* 1996, Herath *et al.* 2006). Diese Beobachtung könnte möglicherweise erklären, wieso postpartale Tiere mit geschädigten endometrialen Epithelzellen als Reaktion auf intrauterine Endotoxine vermehrt das luteotrope PGE2 aus dem Stroma freisetzen und damit eine Prolongation der Gelbkörperphase bewirken, während bei den Tieren der vorliegenden Studie mit intakten Epithelzellen des Endometriums eine Ausschüttung von PGF2 α und damit eine Luteolyse induziert wird.

Die P4-Konzentrationen im Plasma waren im LPS-Zyklus an den Tagen 6, 8 und 9 signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrolle und kennzeichnen die Induktion einer funktionellen Luteolyse durch LPS. In einer anderen Studie (Williams *et al.* 2008), in der die intrauterine LPS-Applikation in derselben Konzentration und zu denselben Zeitpunkten erfolgte wie in der vorliegenden Studie, war die Plasma-P4-Konzentration zwischen Tag 3 und 9 ebenfalls niedriger als in der Kontrollgruppe. Demgegenüber konnten nach einmaliger intrauteriner LPS-Applikation keine

Auswirkungen auf die P4-Konzentration im Plasma festgestellt werden (Gilbert *et al.* 1990). Die wiederholte Exposition des Endometriums gegenüber LPS scheint also entscheidend zu sein, um einen Effekt auf die luteale P4-Produktion ausüben zu können. Im Gegensatz dazu konnte bereits bei einmaliger intravenöser LPS-Applikation nach einem kurzzeitigen (30min), starken Anstieg der Plasma-P4-Konzentration eine signifikante Reduktion des P4-Spiegels über 40 Stunden (Beginn 9 Stunden nach Applikation) im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Herzog *et al.* 2012). Während der initiale Anstieg des P4-Spiegels auch bei ovariectomierten Tieren auftrat und daher adrenalen Ursprungs zu sein scheint (Kujjo *et al.* 1995), beruht die reduzierte P4-Konzentration auf einer Depression der lutealen Funktionalität. Alle genannten Studien, in denen eine Reduktion des P4-Spiegels nach LPS-Applikation vorlag, beobachteten ebenfalls einen Anstieg der PGFM-Konzentration, während ein solcher Anstieg in der Studie von Gilbert *et al.* (1990), in der keine reduzierten P4-Spiegel auftraten, nicht stattfand. Es ist daher zu vermuten, dass LPS über die Freisetzung von endometrialem PGF2 α die Funktionalität des CL beeinflusst. Da jedoch die *in vitro* Exposition von Lutealzellen gegenüber LPS ebenso zu einer signifikant verminderten P4-Sekretion dieser Zellen führte (Mishra & Dhali 2007), ist ein direkter Effekt von LPS auf das CL ebenfalls nicht ausgeschlossen. Im NLPS-Zyklus waren die P4-Konzentrationen im Plasma an den Tagen 2 und 4 signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrolle. Für diesen Unterschied kommt neben einem Carry-over Effekt von LPS aus dem vorangegangenen Zyklus auch die Variabilität im tatsächlichen Alter der Corpora lutea zum festgesetzten Zeitpunkt der Ovulation (Tag 1) als Ursache in Frage.

Die Grösse des Gelbkörpers, gemessen als Querschnittsfläche des Lutealgewebes, war nach intrauteriner LPS-Applikation an den Tagen 8 und 9 signifikant kleiner als im Kontrollzyklus. Die Größenreduktion des CL kennzeichnet dabei die strukturelle Luteolyse, die sich der funktionellen Luteolyse anschliesst. Obwohl es bislang keine genaueren Untersuchungen über die Auswirkungen einer wiederholten LPS-Applikation auf das bovine CL gibt, wurde eher ein luteotroper Effekt aufgrund einer erhöhten endometrialen PGE-Ausschüttung und damit verlängerte statt verkürzte Lutealphasen erwartet (Herath *et al.* 2009). Die Größenreduktion des CL in der vorliegenden Studie steht jedoch im Einklang mit der 24 Stunden nach einmaliger intravenöser LPS-Applikation beobachteten Suppression der Gelbkörpergrösse, welche jedoch im Unterschied zur vorliegenden Studie nicht in einer vollständigen

Luteolyse, sondern in einer Erholung des CL mit Wiedererlangung der ursprünglichen Grösse resultierte (Herzog *et al.* 2012). Da nach einer *in vitro* Exposition von Lutealzellen gegenüber LPS eine Apoptose dieser Zellen nachgewiesen wurde (Mishra & Dhali 2007), kommt (wie bei der funktionellen Luteolyse) für die strukturelle Luteolyse neben der LPS-induzierten endometrialen Freisetzung von PGF2 α auch ein direkter apoptotischer Effekt von LPS als Ursache infrage. Auch ein synergistischer Effekt beider Mechanismen wäre denkbar. Die Lutealgewebsfläche war hingegen im PBS-Zyklus an den Tagen 8 und 9 im Vergleich zum Kontrollzyklus grösser. Dieser Unterschied ist allerdings artifiziell und beruht auf der Verwendung der Summe der Gelbkörperflächen bei Vorliegen einer Doppelovulation gemäss Bollwein *et al.* (2002). Wurde statt der Summe der Mittelwert der Gelbkörperflächen verwendet, war der Unterschied nicht länger nachweisbar.

Die Gelbkörperdurchblutung war im LPS-Zyklus an den Tagen 6, 8 und 9 signifikant niedriger als im Kontrollzyklus. Die exakte zeitliche Übereinstimmung des Auftretens des reduzierten lutealen Blutflusses und der reduzierten Plasma-P4-Konzentration verdeutlicht den engen Zusammenhang zwischen der Durchblutung und Funktionalität des CL. Nach einmaliger intravenöser LPS-Applikation fiel die luteale Durchblutung 3 Stunden später um 34% im Vergleich zur Kontrollgruppe ab und blieb bis 48 Stunden später signifikant niedriger (Herzog *et al.* 2012). Eine Abnahme der lutealen Durchblutung wurde auch nach induzierter Luteolyse zusammen mit einer Abnahme des Lutealvolumens beschrieben (Trevisol *et al.* 2015). Die Reduktion des lutealen Blutflusses in der vorliegenden Studie stimmt daher mit der herabgesetzten P4-Produktion und der Grössenabnahme des CL im Rahmen der funktionellen und strukturellen Luteolyse überein. Im PBS-Zyklus war die Durchblutung der Gelbkörper am Tag 9 signifikant höher als die der Kontrolle. Die Ursache dafür ist in Analogie zur Gelbkörpergrösse ebenfalls in der Verwendung der Summe der durchbluteten Lutealflächen bei Vorliegen einer Doppelovulation zu sehen. Bei Verwendung des Mittelwertes war dieser Unterschied zwischen dem PBS- und CON-Zyklus nicht länger nachweisbar.

Die geringere Anzahl an Follikelwellen im LPS-Zyklus kann durch die frühzeitige Luteolyse erklärt werden, da unter fehlendem Progesteroneinfluss bereits die erste Follikelwelle zur Ovulation kommt. Interessanterweise war der maximale Durchmesser des dominanten Follikels der ersten Welle im NLPS-Zyklus grösser als

im Kontrollzyklus. Ursächlich dafür sind wahrscheinlich die signifikant niedrigeren Plasma-P4-Konzentrationen zu Beginn des NLPS-Zyklus verglichen mit dem Kontrollzyklus, da der maximale Follikeldurchmesser bei einem niedrigeren Progesteronspiegel erhöht ist (Adams *et al.* 1992, Cerri *et al.* 2011).

Die mRNA Genexpression von *STAR* und *HSD3B* war im LPS-Zyklus signifikant niedriger als im Kontrollzyklus. Auch 12 Stunden nach einmaliger intravenöser LPS-Applikation konnte ein Abfall in der mRNA Expression von *STAR* im Vergleich zu unbehandelten Tieren festgestellt werden (Herzog *et al.* 2012). Andere Autoren berichteten nach einer mittels PGF2 α induzierten Luteolyse ebenfalls von einer herabgesetzten mRNA Expression von *STAR* (Tsai *et al.* 2001, Shirasuna *et al.* 2010, Atli *et al.* 2012) und *HSD3B* (Tsai *et al.* 2001, Shirasuna *et al.* 2010). Da die steroidogenen Faktoren *STAR* und *HSD3B* wichtige Schlüsselenzyme für die Synthese von P4 darstellen (Stocco & Clark 1996, Niswender 2002), erklärt ihre reduzierte Expression die in der vorliegenden Studie beobachteten niedrigen Plasma-P4-Konzentrationen im Rahmen der funktionellen Regression des Gelbkörpers.

Während die mRNA Expression von *TLR4* im LPS-Zyklus signifikant höher war als im Kontrollzyklus, unterschied sich die Genexpression von *TLR2* nicht zwischen den LPS- und Kontrollzyklen. Im Gegensatz zu *TLR4*, welches sehr selektiv LPS bindet (Chow *et al.* 1999, Qureshi *et al.* 1999, Matsumura *et al.* 2000, Takeuchi & Akira 2010, Moresco *et al.* 2011), ist *TLR2* in der Lage, unterschiedliche Komponenten von grampositiven Bakterien, Mykoplasmen und Pilzen zu erkennen (Lien *et al.* 1999, Takeuchi *et al.* 1999, Takeuchi & Akira 2010, Moresco *et al.* 2011). Da also *TLR4* für die Bindung von LPS an Zellen benötigt wird (Beutler 2004), deutet die erhöhte Expression von *TLR4* in den Lutealzellen darauf hin, dass das intrauterin verabreichte LPS in der vorliegenden Studie direkt am CL ankommt. Dass intrauterines LPS zum Ovar gelangen kann, belegen mehrere Nachweise von LPS im Blut und in der Follikelflüssigkeit von Rindern mit einer Metritis (Mateus *et al.* 2003, Herath *et al.* 2007, Magata *et al.* 2015). Die enge Verbindung zwischen der *V. uterina* und der *A. ovarica* beim Rind erleichtert ausserdem den Transport uterin sezernierter Hormone zum Ovar (Ginther 1974), und könnte daher auch den Transport von LPS zum Ovar begünstigen. Da eine Ausschüttung von endometrialem PGF2 α direkt durch LPS über den *TLR4* im bovinen Endometrium ausgelöst werden konnte

(Herath *et al.* 2006), erscheint auch ein direkter, durch LPS über den TLR4 im bovinen CL induzierter, luteolytischer Effekt möglich. Da ein Wirkungsmechanismus bislang allerdings nicht bekannt ist, ist diese Vermutung gegenwärtig noch spekulativ.

Die mRNA Expression von *TNFA* unterschied sich in der vorliegenden Studie nicht zwischen dem LPS- und Kontrollzyklus. Bereits 15 Minuten nach einer mittels PGF2 α induzierten Luteolyse stieg die Expression von *TNFA* zwar signifikant an, fiel aber 12 Stunden später wieder auf das ursprüngliche Niveau zurück (Nitta *et al.* 2013). Vergleichbare Expressionsmuster von *TNFA* konnten auch in einer früheren Studie dargestellt werden (Petroff *et al.* 1999). Die im Vergleich zum Kontrollzyklus unveränderte Expression von *TNFA* im LPS-Zyklus der vorliegenden Studie könnte also dadurch verursacht sein, dass die Luteolyse bereits vor Tag 6 eingeleitet wurde und die Expression bereits wieder auf das Ursprungsniveau zurückgefallen ist.

In der vorliegenden Studie war die mRNA Expression der *CASP3* nach LPS-Applikation signifikant höher als in der Kontrolle. Ein signifikanter Anstieg der lutealen Expression von *CASP3* konnte auch nach einmaliger intravenöser LPS-Applikation (Herzog *et al.* 2012) sowie nach einer mittels PGF2 α induzierten Luteolyse nachgewiesen werden (Kliem *et al.* 2009). Da *CASP3* als Hauptkennzeichen für die Induktion einer Apoptose gilt (Carambula *et al.* 2002), bestätigt ihre erhöhte Expression den Ablauf apoptotischer Vorgänge, der im Rahmen der beobachteten strukturellen Luteolyse erwartet wird.

Während die luteale mRNA Expression von *PGES* im LPS-Zyklus signifikant höher war als im Kontrollzyklus, unterschied sich die Expression von *PGFS* nicht zwischen LPS- und Kontrollzyklus. In Zellkulturen und Gewebeexplantaten stimulierten Uterus-pathogene Bakterien wie *E. coli* die Sekretion von PGE2 (Herath *et al.* 2006). Ausserdem waren die PGE2-Konzentrationen in der uterinen Flüssigkeit bei einer schweren Endometritis signifikant höher als bei einer milden Endometritis (Mateus *et al.* 2003), sodass die beobachtete Induktion einer erhöhten PGE-Synthese durch LPS im CL ebenfalls nachvollziehbar erscheint. Bei einer mittels PGF2 α induzierten Luteolyse konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der lutealen Expression von *PGES* im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Shirasuna *et al.* 2010). Im Gegensatz dazu war die Expression von *PGFS* nach induzierter Luteolyse zwischen Tag 8 und 12 (Shirasuna *et al.* 2010) bzw. am Tag 9 (Atli *et al.* 2012) signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Während die Induktion einer

Luteolyse in der mittleren Lutealphase also eine erhöhte Expression von *PGFS* zur Folge hatte, führte sie in der frühen Lutealphase (bis Tag 5) zu einer tendenziellen Reduktion der *PGFS*-Expression (Shirasuna *et al.* 2010). Da die Gelbkörperbiopsie in der vorliegenden Studie am Tag 6 und damit, entsprechend der Einteilung von Shirasuna *et al.* (2010), zwischen der frühen und mittleren Lutealphase stattfand, könnten sich die Expressionserhöhung und –reduktion von *PGFS* gegenseitig aufgehoben haben. Die mRNA Expression von *PTGFR* war im LPS-Zyklus der vorliegenden Studie signifikant niedriger als im Kontrollzyklus. Auch nach einer mittels $\text{PGF2}\alpha$ induzierten Luteolyse konnte ein Abfall der lutealen Expression von *PTGFR* festgestellt werden (Sakamoto *et al.* 1995, Levy *et al.* 2000, Tsai *et al.* 2001, Atli *et al.* 2012, Shirasuna *et al.* 2012), sodass eine erhöhte Konzentration von $\text{PGF2}\alpha$ am CL für diesen Effekt verantwortlich zu sein scheint.

Während die mRNA Expression von *VEGFA*₁₂₁ im LPS-Zyklus signifikant niedriger im Vergleich zum Kontrollzyklus war, konnte bei der Expression von *FGF2* kein signifikanter Unterschied zwischen den Zyklen festgestellt werden. Nach einer mittels $\text{PGF2}\alpha$ induzierten Luteolyse war im Zusammenhang mit der Regression des Gelbkörpers ebenfalls eine Abnahme der mRNA Expression verschiedener Isoformen von *VEGFA* sichtbar (Shirasuna *et al.* 2010, Atli *et al.* 2012). Die reduzierte mRNA Expression des für die Angiogenese zuständigen Faktors *VEGFA* (Fraser *et al.* 2000) am Tag 6 im LPS-Zyklus stimmt ausserdem mit der ab Tag 6 reduzierten Durchblutung des CL in der vorliegenden Studie überein. Hinsichtlich des ebenfalls angiogenen Faktors *FGF2* führte eine mittels $\text{PGF2}\alpha$ induzierte Luteolyse in der frühen Lutealphase (bis Tag 5 nach der Ovulation) zu einer erhöhten und in der mittleren Lutealphase (Tag 8 bis 12) zu einer reduzierten mRNA Expression im Vergleich zur Kontrolle (Shirasuna *et al.* 2010). Der weder signifikante Anstieg noch Abfall der Expression von *FGF2* in der vorliegenden Studie lässt sich eventuell damit erklären, dass die Gelbkörperbiopsie am Tag 6 erfolgte und sich damit zwischen den bei Shirasuna *et al.* (2010) genannten Gelbkörperphasen befand. Auch der Zeitpunkt der Untersuchung relativ zum Beginn der Luteolyse könnte eine Rolle spielen, da zunächst 4 bis 12 Stunden nach induzierter Luteolyse eine Erhöhung und anschließend nach 24 Stunden eine Abnahme der Expression von *FGF2* stattfand (Vonnahme *et al.* 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine mittels wiederholter intrauteriner LPS-Applikationen induzierte subklinische Endometritis während der ersten 9 Zyklostage zu einer vorzeitigen Luteolyse und damit zu einem verkürzten Zyklus führt. Da dieser Effekt bei einer subklinischen Endometritis durch wiederholte intrauterine Applikationen von PBS nicht auftrat, scheint der Effekt LPS-gebunden zu sein. Die erhöhten PGFM-Konzentrationen im Plasma nach LPS-Applikation lassen eine LPS-induzierte uterine Freisetzung von PGF 2α als Ursache vermuten, wobei eine (zusätzliche) direkte Wirkung von LPS über TLR4 auf das Corpus luteum ebenfalls nicht ausgeschlossen werden kann.

VIII. Literaturverzeichnis

- Adams GP, Matteri RL & Ginther OJ** 1992 Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J Reprod Fertil* **96** 627-640.
- Asselin E, Goff AK, Bergeron H & Fortier MA** 1996 Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F2 alpha and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol Reprod* **54** 371-379.
- Atli MO, Bender RW, Mehta V, Bastos MR, Luo W, Vezina CM & Wiltbank MC** 2012 Patterns of gene expression in the bovine corpus luteum following repeated intrauterine infusions of low doses of prostaglandin F2alpha. *Biol Reprod* **86**.
- Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL & Palmer CW** 2008 A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* **69** 714-723.
- Battaglia DF, Krasa HB, Padmanabhan V, Viguie C & Karsch FJ** 2000 Endocrine alterations that underlie endotoxin-induced disruption of the follicular phase in ewes. *Biol Reprod* **62** 45-53.
- Beindorff N, Honnens A, Penno Y, Paul V & Bollwein H** 2009 Effects of human chorionic gonadotropin on luteal blood flow and progesterone secretion in cows and in vitro-microdialyzed corpora lutea. *Theriogenology* **72** 528-534.
- Beutler B** 2004 Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* **430** 257-263.

- Bollwein H, Mayer R, Weber F & Stolla R** 2002 Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* **57** 2043-2051.
- Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Goncalves PB, Tilly JL & Rueda BR** 2002 Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology* **143** 1495-1501.
- Cerri RL, Chebel RC, Rivera F, Narciso CD, Oliveira RA, Thatcher WW & Santos JE** 2011 Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. Ovarian and embryonic responses. *J Dairy Sci* **94** 3342-3351.
- Cheong SH, Nydam DV, Galvao KN, Crosier BM & Gilbert RO** 2011 Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* **94** 762-770.
- Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ & Gusovsky F** 1999 Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* **274** 10689-10692.
- De Vries A** 2006 Economic value of pregnancy in dairy cattle. *J Dairy Sci* **89** 3876-3885.
- Deguillaume L, Geffre A, Desquilbet L, Dizien A, Thoumire S, Vorniere C, Constant F, Fournier R & Chastant-Maillard S** 2012 Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. *J Dairy Sci* **95** 1776-1783.
- Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS & LeBlanc SJ** 2010 Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci* **93** 5225-5233.
- Edmonson A, Lean I, Weaver L, Farver T & Webster G** 1989 A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* **72** 68-78.

- Farin PW, Ball L, Olson JD, Mortimer RG, Jones RL, Adney WS & McChesney AE** 1989 Effect of *Actinomyces pyogenes* and gram-negative anaerobic bacteria on the development of bovine pyometra. *Theriogenology* **31** 979-989.
- Fortune JE** 1994 Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* **50** 225-232.
- Fraser HM, Dickson SE, Lunn SF, Wulff C, Morris KD, Carroll VA & Bicknell R** 2000 Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology* **141** 995-1000.
- Gabler C, Drillich M, Fischer C, Holder C, Heuwieser W & Einspanier R** 2009 Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. *Theriogenology* **71** 993-1004.
- Gautam G, Nakao T, Yusuf M & Koike K** 2009 Prevalence of endometritis during the postpartum period and its impact on subsequent reproductive performance in two Japanese dairy herds. *Anim Reprod Sci* **116** 175-187.
- Gilbert RO** 2011 The effects of endometritis on the establishment of pregnancy in cattle. *Reprod Fertil Dev* **24** 252-257.
- Gilbert RO, Bosu WT & Peter AT** 1990 The effect of *Escherichia coli* endotoxin on luteal function in Holstein heifers. *Theriogenology* **33** 645-651.
- Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN & Frajblat M** 2005 Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* **64** 1879-1888.
- Ginther OJ** 1974 Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. *J Anim Sci* **39** 550-564.
- Handler J, Hoffmann D, Weber F, Schams D & Aurich C** 2006 Oxytocin does not contribute to the effects of cervical dilation on progesterone secretion and embryonic development in mares. *Theriogenology* **66** 1397-1404.

- Herath S, Fischer DP, Werling D, Williams EJ, Lilly ST, Dobson H, Bryant CE & Sheldon IM** 2006 Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology* **147** 562-570.
- Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE & Sheldon IM** 2009 Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2alpha to prostaglandin E2 in bovine endometrium. *Endocrinology* **150** 1912-1920.
- Herath S, Williams EJ, Lilly ST, Gilbert RO, Dobson H, Bryant CE & Sheldon IM** 2007 Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction* **134** 683-693.
- Herzog K, Struve K, Kastelic JP, Piechotta M, Ulbrich SE, Pfarrer C, Shirasuna K, Shimizu T, Miyamoto A & Bollwein H** 2012 Escherichia coli lipopolysaccharide administration transiently suppresses luteal structure and function in diestrous cows. *Reproduction* **144** 467-476.
- Johnson ML, Redmer DA & Reynolds LP** 1997 Uterine growth, cell proliferation, and c-fos proto-oncogene expression throughout the estrous cycle in ewes. *Biol Reprod* **56** 393-401.
- Kliem H, Berisha B, Meyer HH & Schams D** 2009 Regulatory changes of apoptotic factors in the bovine corpus luteum after induced luteolysis. *Mol Reprod Dev* **76** 220-230.
- Kujjo LL, Bosu WTK & Perez GI** 1995 Opioid peptides involvement in endotoxin-induced suppression of LH secretion in ovariectomized holstein heifers. *Reproductive Toxicology* **9** 169-174.
- Lavon Y, Leitner G, Goshen T, Braw-Tal R, Jacoby S & Wolfenson D** 2008 Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. *Theriogenology* **70** 956-967.

LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS &

Johnson WH 2002 Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci* **85** 2223-2236.

Leung ST, Cheng Z, Sheldrick EL, Derecka K, Derecka K, Flint AP & Wathes DC

2001 The effects of lipopolysaccharide and interleukins-1alpha, -2 and -6 on oxytocin receptor expression and prostaglandin production in bovine endometrium. *J Endocrinol* **168** 497-508.

Levy N, Kobayashi S, Roth Z, Wolfenson D, Miyamoto A & Meidan R 2000

Administration of prostaglandin f(2 alpha) during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and of its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. *Biol Reprod* **63** 377-382.

Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD,

Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD & Golenbock DT 1999 Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* **274** 33419-33425.

Livak KJ & Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25** 402-408.

Lopez-Gatius F 2003 Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology* **60** 89-99.

Ma JL, Zhu YH, Zhang L, Zhuge ZY, Liu PQ, Yan XD, Gao HS & Wang JF 2011

Serum concentration and mRNA expression in milk somatic cells of toll-like receptor 2, toll-like receptor 4, and cytokines in dairy cows following intramammary inoculation with *Escherichia coli*. *J Dairy Sci* **94** 5903-5912.

- Magata F, Horiuchi M, Echizenya R, Miura R, Chiba S, Matsui M, Miyamoto A, Kobayashi Y & Shimizu T** 2014b Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. *Anim Reprod Sci* **144** 6-13.
- Magata F, Horiuchi M, Miyamoto A & Shimizu T** 2014a Lipopolysaccharide (LPS) inhibits steroid production in theca cells of bovine follicles in vitro: distinct effect of LPS on theca cell function in pre- and post-selection follicles. *J Reprod Dev* **60** 280-287.
- Magata F, Ishida Y, Miyamoto A, Furuoka H, Inokuma H & Shimizu T** 2015 Comparison of bacterial endotoxin lipopolysaccharide concentrations in the blood, ovarian follicular fluid and uterine fluid: a clinical case of bovine metritis. *J Vet Med Sci* **77** 81-84.
- Mateus L, da Costa LL, Bernardo F & Silva JR** 2002 Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod Domest Anim* **37** 31-35.
- Mateus L, Lopes da Costa L, Diniz P & Ziecik AJ** 2003 Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. *Anim Reprod Sci* **76** 143-154.
- Matsumura T, Ito A, Takii T, Hayashi H & Onozaki K** 2000 Endotoxin and cytokine regulation of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 gene expression in murine liver and hepatocytes. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **20** 915-921.
- Mishra DP & Dhali A** 2007 Endotoxin induces luteal cell apoptosis through the mitochondrial pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **83** 75-88.

- Mishra DP, Meyer HH & Prakash BS** 2003 Validation of a sensitive enzymeimmunoassay for 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂alpha in buffalo plasma and its application for reproductive health status monitoring. *Anim Reprod Sci* **78** 33-46.
- Moresco EM, LaVine D & Beutler B** 2011 Toll-like receptors. *Curr Biol* **21** 039.
- Mosher RA, Wang C, Allen PS & Coetzee JF** 2013 Comparative effects of castration and dehorning in series or concurrent castration and dehorning procedures on stress responses and production in Holstein calves. *J Anim Sci* **91** 4133-4145.
- Mudron P, Herzog K, Holtershinken M & Rehage J** 2007 Effects of abdominal surgery on thiobarbituric acid reactive substances and plasma anti-oxidative capacity in dairy cows. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **54** 441-444.
- Murata H, Shimada N & Yoshioka M** 2004 Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* **168** 28-40.
- Niswender GD** 2002 Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction* **123** 333-339.
- Nitta A, Shirasuna K, Nibuno S, Bollwein H, Shimizu T & Miyamoto A** 2013 Downregulation of lymphatic vessel formation factors in PGF₂alpha-induced luteolysis in the cow. *J Reprod Dev* **59** 296-301.
- Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H & de Kruif A** 2000 Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* **53** 841-857.
- Peter AT, Bosu WT & DeDecker RJ** 1989 Suppression of preovulatory luteinizing hormone surges in heifers after intrauterine infusions of Escherichia coli endotoxin. *Am J Vet Res* **50** 368-373.

- Peter AT, Bosu WT & Gilbert RO** 1990 Absorption of Escherichia coli endotoxin (lipopolysaccharide) from the uteri of postpartum dairy cows. *Theriogenology* **33** 1011-1014.
- Petroff MG, Petroff BK & Pate JL** 1999 Expression of cytokine messenger ribonucleic acids in the bovine corpus luteum. *Endocrinology* **140** 1018-1021.
- Prieto M, Barrio M, Quintela L, Perez-Martin C, Becerra J, Vigo M, Diaz C, Cainzos J, Prieto A & Fernandez F** 2012 Validation of simple method for the interpretation of uterine cytology in cows. *Veterinarni Medicina* **57** 360-363.
- Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P & Malo D** 1999 Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* **189** 615-625.
- Sakamoto K, Miwa K, Ezashi T, Okuda-Ashitaka E, Okuda K, Houtani T, Sugimoto T, Ito S & Hayaishi O** 1995 Expression of mRNA encoding the prostaglandin F2 alpha receptor in bovine corpora lutea throughout the oestrous cycle and pregnancy. *J Reprod Fertil* **103** 99-105.
- Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G & Schuberth HJ** 2009 Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod* **81** 1025-1032.
- Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU & Dobson H** 2002 Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* **123** 837-845.
- Sheldon IM & Roberts MH** 2010 Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium. *PLoS One* **5** 0012906.

- Shimizu T, Miyauchi K, Shirasuna K, Bollwein H, Magata F, Murayama C & Miyamoto A** 2012 Effects of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on estradiol production in bovine granulosa cells from small and large follicles. *Toxicol In Vitro* **26** 1134-1142.
- Shirasuna K, Akabane Y, Beindorff N, Nagai K, Sasaki M, Shimizu T, Bollwein H, Meidan R & Miyamoto A** 2012 Expression of prostaglandin F2alpha (PGF2alpha) receptor and its isoforms in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and PGF2alpha-induced luteolysis. *Domest Anim Endocrinol* **43** 227-238.
- Shirasuna K, Sasahara K, Matsui M, Shimizu T & Miyamoto A** 2010 Prostaglandin F2alpha differentially affects mRNA expression relating to angiogenesis, vasoactivation and prostaglandins in the early and mid corpus luteum in the cow. *J Reprod Dev* **56** 428-436.
- Souza AH, Silva EP, Cunha AP, Gumen A, Ayres H, Brusveen DJ, Guenther JN & Wiltbank MC** 2011 Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology* **75** 722-733.
- Stocco DM & Clark BJ** 1996 Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol* **51** 197-205.
- Suzuki C, Yoshioka K, Iwamura S & Hirose H** 2001 Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein heifers. *Domest Anim Endocrinol* **20** 267-278.
- Takeuchi O & Akira S** 2010 Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140** 805-820.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K &

Akira S 1999 Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11** 443-451.

Thun R, Eggenberger E, Zerobin K, Luscher T & Vetter W 1981 Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: evidence of episodic secretion and circadian rhythm. *Endocrinology* **109** 2208-2212.

Trevisol E, Ferreira JC, Ackermann CL, Destro FC, Marques Filho WC, Carmagos AS, Biehl MV, do Amaral JB, de Figueiredo Pantoja JC, Sartori R & Ferreira JC 2015 Luteal changes after treatment with sub-luteolytic doses of prostaglandin (cloprostenol sodium) in cattle. *Anim Reprod Sci* **153** 8-12.

Tsai SJ, Kot K, Ginther OJ & Wiltbank MC 2001 Temporal gene expression in bovine corpora lutea after treatment with PGF₂alpha based on serial biopsies in vivo. *Reproduction* **121** 905-913.

Ulbrich SE, Schulke K, Groebner AE, Reichenbach HD, Angioni C, Geisslinger G & Meyer HH 2009 Quantitative characterization of prostaglandins in the uterus of early pregnant cattle. *Reproduction* **138** 371-382.

Vonnahme KA, Redmer DA, Borowczyk E, Bilski JJ, Luther JS, Johnson ML, Reynolds LP & Grazul-Bilska AT 2006 Vascular composition, apoptosis, and expression of angiogenic factors in the corpus luteum during prostaglandin F₂alpha-induced regression in sheep. *Reproduction* **131** 1115-1126.

Walsh SW, Williams EJ & Evans AC 2011 A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci* **123** 127-138.

Williams EJ, Sibley K, Miller AN, Lane EA, Fishwick J, Nash DM, Herath S, England GC, Dobson H & Sheldon IM 2008 The effect of *Escherichia coli*

lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function. *Am J Reprod Immunol* **60** 462-473.

Danksagung

An erster Stelle gilt der größte Dank Prof. Dr. Heinrich Bollwein für die Überlassung des sehr interessanten Themas, für die Betreuung und Unterstützung während der Dissertation und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Die praktischen Versuche und die schriftliche Ausarbeitung der Studie haben mich sowohl fachlich als auch persönlich sehr viel weiter gebracht, als ich es mir zu Anfang vorstellen konnte. Vielen herzlichen Dank dafür.

Meinem wissenschaftlichen Betreuer Dr. Johannes Lüttgenau möchte ich im allerhöchsten Maße von ganzem Herzen danken. Ich habe mich zu jeder Zeit perfekt betreut gefühlt und keine Frage ist offen geblieben. Außerdem möchte ich mich für alles Bedanken, was mir beigebracht wurde. Ich würde die Dissertation zu jeder Zeit mit dieser exzellenten wissenschaftlichen Betreuung erneut anfertigen.

Es geht auch ein Dank an Prof. Dr. Rupert Bruckmaier, PD Dr. Olga Wellnitz, alle wissenschaftlichen Mitarbeiter, Doktorierenden, Laborassistentinnen und das Stallpersonal der Veterinärphysiologie der Universität Bern in Posieux für die herzliche Aufnahme, die Untersuchung der Proben und die Hilfe bei Problemen verschiedenster Art. Ich habe mich stets sehr willkommen gefühlt und habe die Zeit in Posieux sehr genossen.

Desweiteren bedanke ich mich bei Jun.-Prof. Dr. Marion Piechotta vom Endokrinologischen Labor der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover für die Untersuchung der Blutproben auf PGFM und bei Prof. Dr. Susanne Ulbrich und Anna-Katharina Hankele von der Tierphysiologie der ETH Zürich für die Untersuchung der Gelbkörperbioptate.

Bedanken möchte ich mich besonders bei meiner Familie, bei Verwandten und Freunden, auf deren Unterstützung ich bei dieser Arbeit und auf dem Weg dahin immer zählen konnte. Vielen Dank dafür!

Ein riesiger Dank gilt meiner Verlobten Annika Mohr, die mich immer in allen Dingen unterstützt hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne sie hätte mir diese Arbeit nur halb so viel Freude gemacht.